



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

INTERAÇÃO ENTRE *ESCHERICHIA COLI* UTEROPATOGÉNICA E AS CÉLULAS
EPITELIAIS E DO ESTROMA DO ENDOMÉTRIO CANINO

MARTA FILIPA SERRA DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro
de Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Elisabete Tomé Sousa Silva

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

INTERAÇÃO ENTRE *ESCHERICHIA COLI* UTEROPATOGÉNICA E AS CÉLULAS
EPITELIAIS E DO ESTROMA DO ENDOMÉTRIO CANINO

MARTA FILIPA SERRA DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro
de Oliveira

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

CO-ORIENTADOR

Doutora Maria Elisabete Tomé Sousa Silva

2014

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Neste percurso académico foram várias as pessoas que me apoiaram e a quem não posso deixar de agradecer.

Agradeço à minha orientadora, a Professora Doutora Luísa Mateus, que no 4º ano me deu a conhecer o trabalho que se desenvolvia no laboratório na área da Reprodução e Obstetrícia e que posteriormente aceitou orientar-me. Obrigada por todos os conhecimentos que me transmitiu e pelo tempo que me dedicou nesta orientação.

À minha co-orientadora, a Doutora Elisabete Silva, que muito me ensinou neste último ano. Obrigada por toda a preocupação, ajuda e disponibilidade, tanto dentro do horário de trabalho como fora dele.

À Dr.^a Sofia Henriques que me acompanhou durante este ano, agradeço por toda a paciência e dedicação com que me ensinou a executar técnicas de laboratório com as quais nunca tinha contactado, e por toda a ajuda prestada na elaboração deste trabalho.

À Engenheira Patrícia Diniz por tudo o que ensinou a respeito de cultura de células. Agradeço também à Mestre Mariana Batista por todo o auxílio que nos deu neste trabalho.

A todos da equipa da Reprodução e Obstetrícia que me receberam tão bem. Nunca irei esquecer alguns dos momentos deste estágio, particularmente os momentos de convívio e alimentação.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) pelo apoio financeiro concedido e por ter permitido a utilização das suas instalações e equipamentos para a elaboração deste trabalho. Agradeço também a todos os que trabalham no laboratório pela simpatia com que me receberam.

À Dra. Sílvia Cruz e ao Tiago Gonçalves, voluntário no Canil Municipal de Sintra, pelas ovariectomias realizadas, essenciais para a obtenção de material biológico. Ao Canil Municipal de Sintra, Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa, Consultório Veterinário do Instituto Zoófilo Quinta Carbone, Clínica da Liga Portuguesa dos Direitos dos Animais e aos seus corpos clínicos por colaborarem na realização deste trabalho.

À equipa de Anatomia Patológica, particularmente à D^a Maria do Rosário Luís e Sandra Carvalho pela disponibilidade e serviços prestados no processamento do material para análise histopatológica.

Deixo também um agradecimento muito especial à minha mãe, que me tornou naquilo que sou hoje. Na realidade não existem palavras que expressem o quanto me sinto agradecida à pessoa que é capaz de me aquecer por dentro com um simples sorriso e que me conforta diariamente.

Agradeço também ao meu pai por ter permitido que realizasse este sonho de me tornar Médica Veterinária.

Aos meus amigos que me acompanham desde os primeiros dias em que pisei o chão desta faculdade. A Catarina, a Lara, a Andreia, o José, a Eva e a Inês, que me apoiaram nos bons e maus momentos dos últimos seis anos. Sem dúvida que esta jornada não teria sido tão boa sem a vossa companhia e todos os momentos felizes que juntos criámos.

A todos aqueles que me fizeram e fazem sorrir, um sincero obrigada.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto CIISA/FMV 74 – Hiperplasia do endométrio, tendo sido financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA).

RESUMO

Interação entre *Escherichia coli* uteropatogénica e as células epiteliais e do estroma do endométrio canino

A piómetra é uma doença de diestro comum em cadelas adultas, sendo *Escherichia coli* o agente mais frequentemente isolado. Neste estudo estabeleceu-se um modelo de cultura primária de células epiteliais e do estroma, para avaliar: a) adesão e internalização de *E. coli*; b) resposta imunitária inata.

Os ensaios de adesão e internalização, com duas estirpes de *E. coli* de diferente genótipo de virulência, demonstraram que *E. coli* aderiu às células epiteliais e do estroma. Os resultados de internalização sugerem que este mecanismo não deverá estar envolvido na patogenicidade deste agente na piómetra. Nas células epiteliais, *E. coli* conduziu a um aumento da transcrição de genes de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e interferão- β . No estroma observou-se principalmente aumento da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias. Contudo, a transcrição do gene da citocina pró-inflamatória IL-1 β e da anti-inflamatória IL-10 foi inibida nestas células por uma das estirpes de *E. coli*. Conclui-se que (1) o sistema de cultura de células implementado é uma ferramenta útil para estudo da fase inicial de infeção por *E. coli* na piómetra (2) as células epiteliais e do estroma desempenham um papel importante na resposta inflamatória; (3) a resposta imunitária desencadeada parece depender da virulência da estirpe de *E. coli*.

Palavras-chave: Piómetra; *Escherichia coli*; Adesão; Internalização; Imunidade inata; Citocinas.

ABSTRACT

Interaction between uteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial and stromal cells of the canine endometrium

Pyometra is a common diestrous disease of bitches and *Escherichia coli* is the most frequently isolated bacteria. In this study we established primary epithelial and stromal cell cultures to assess: a) adhesion and invasion of *E. coli*; b) the innate immune response.

Adhesion and invasion assays with two *E. coli* strains of different virulence genotypes showed that *E. coli* adhered to epithelial and stromal cells. The invasion results suggest that this mechanism is probably not involved in the pathogenicity of *E. coli* in pyometra. In epithelial cells, *E. coli* induced an increased transcription of the chemokine, pro-inflammatory cytokine and interferon- β genes. In stromal cells, it was observed mainly an increased transcription in the pro-inflammatory cytokine genes. However, the transcription of the gene for the pro-inflammatory cytokine IL-1 β and for the anti-inflammatory cytokine IL-10 was inhibited in stromal cells by one of the strains. The results obtained suggest that (1) the established cell culture system is an useful model to study the early phase of *E. coli* infection, in the scope of uterine infection; (2) both epithelial and stromal cells have a key role in the inflammatory response; (3) The immune response triggered seems to depend of the virulence genotype.

Key words: Pyometra; *Escherichia coli*; Adhesion; Invasion; Innate immunity; Cytokines.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE GERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xi
RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
I. Piómetra.....	2
1. Epidemiologia.....	2
2. Fisiopatologia.....	3
2.1 Fatores hormonais.....	4
2.1.1 Imunossupressão no diestro.....	4
2.2 Complexo Hiperplasia Quística do Endométrio - Piómetra.....	5
2.2.1 Alterações na expressão de recetores hormonais e fatores de crescimento..	6
2.3 Agentes infecciosos.....	7
II. <i>Escherichia coli</i>	8
1. Fatores de virulência.....	9
1.1 Lipopolissacárido.....	9
1.2 Adesinas.....	10
1.3 Sistemas de captação de ferro.....	11
1.4 Toxinas.....	12
1.3.1 Fator Citotóxico Necrosante 1.....	12
1.3.2 α -hemolisina.....	13
1.5 Evasão das defesas do hospedeiro.....	13
III. Imunidade no útero.....	14
1. Recetores do tipo <i>Toll</i>	14
1.1 Via de sinalização dos recetores do tipo <i>Toll</i>	16

1.2 Efeitos: citocinas e quimiocinas.....	18
OBJETIVOS.....	22
MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
1. Colheita e caracterização das amostras.....	23
1.1 Animais.....	23
1.2 Colheita de amostras.....	23
1.3 Determinação da fase do ciclo éstrico.....	23
2. Isolamento e cultura primária de células epiteliais e do estroma do endométrio da cadelas.....	24
2.1 Isolamento e purificação de células do estroma.....	26
2.2 Isolamento e purificação de células epiteliais glandulares.....	26
2.3 Avaliação da viabilidade, contagem celular e plaqueamento.....	27
2.4 Avaliação da pureza da cultura.....	28
3. Incubação das culturas de células epiteliais e do estroma com <i>Escherichia coli</i>	28
3.1 Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	28
3.2 Preparação da cultura bacteriana para os ensaios de incubação com bactéria...	29
3.3 Preparação das células endometriais para os ensaios de incubação com bactéria.	29
3.4 Ensaio de adesão.....	30
3.5 Ensaio de internalização.....	30
3.6 Colheita de amostras para extração de ARN.....	31
3.7 Contagem de células após estimulação com bactéria.....	31
3.8 Coloração Giemsa.....	32
4. Quantificação relativa da transcrição de componentes das vias dos TLRs por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	32
4.1 Extração de ARN e síntese de ADN complementar (ADNc).....	32
4.2 Oligonucleótidos iniciadores.....	32
4.3 qRT-PCR.....	34
5. Análise estatística.....	35
RESULTADOS.....	36
1. Caracterização da cultura celular: viabilidade, morfologia, crescimento e pureza ...	36
2. Incubação das culturas celulares com <i>Escherichia coli</i>	37
2.1 Análise da morfologia e integridade do tapete celular após incubação com <i>E. coli</i>	37

2.1.1 Cultura de células do estroma.....	37
2.1.2 Cultura de células epiteliais.....	40
2.2 Adesão e internalização de <i>E. coli</i>	42
2.2.1 Adesão.....	42
2.2.2 Internalização.....	44
3. Transcrição de componentes das vias dos recetores do tipo <i>Toll</i>	45
3.1 Transcrição de recetores.....	45
3.2 Transcrição de factores de transcrição.....	46
3.3 Transcrição de quimiocinas.....	46
3.4 Transcrição de citocinas pró-inflamatórias.....	48
3.5 Transcrição de interferão tipo I.....	50
3.6 Transcrição de citocinas anti-inflamatórias.....	50
DICUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Principais fatores envolvidos na fisiopatologia da piómetra	3
Figura 2 – Principais etapas envolvidas no estabelecimento da infecção bacteriana	8
Figura 3 – Vias de sinalização dos TLRs envolvidos no reconhecimento de bactérias Gram-negativas e respetivos ligandos	17
Figura 4 – Principais etapas do protocolo de isolamento e purificação de células endometriais	25
Figura 5 – Aspeto morfológico (coloração Giemsa) da cultura de células epiteliais (A) e da cultura de células do estroma (B).....	36
Figura 6 – Cultura de células do estroma após 1 e 4 horas de incubação com <i>E. coli</i> , visualizadas em microscópio invertido.....	38
Figura 7 – Cultura de células do estroma após o ensaio de internalização.....	39
Figura 8 – Cultura de células epiteliais após o ensaio de internalização.....	41
Figura 9 – Adesão das estirpes Pyo14.1 e Pyo18 às células epiteliais.....	42
Figura 10 – Adesão das estirpes Pyo14.1 e Pyo18 às células do estroma.....	43
Figura 11 – Adesão bacteriana na cultura de células do estroma após 4 horas de incubação com <i>E. coli</i>	44
Figura 12 – Expressão relativa de ARNm da CXCL10 e IL-8 após estimulação com <i>E. coli</i> e LPS, durante 1 e 4 horas.....	47
Figura 13 – Expressão relativa do ARNm do TNF- α , IL-1 β e IL-6 após estimulação com <i>E. coli</i> e LPS, durante 1 e 4 horas.....	49
Figura 14 – Expressão relativa do ARNm do IFN- β após estimulação com <i>E. coli</i> e LPS, durante 1 e 4 horas.....	50
Figura 15 – Expressão relativa do ARNm da IL-10 em células do estroma após estimulação com <i>E. coli</i> e LPS, durante 1 e 4 horas.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Principais citocinas produzidas na resposta inflamatória aguda, células produtoras e respetivas funções	20
Tabela 2 – Oligonucleótidos iniciadores utilizados para PCR em tempo real	33

ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementar
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensageiro
CNF1	Fator citotóxico necrosante 1
COS	Agar Columbia com 5% de sangue de carneiro
C _t	<i>Threshold Cycle</i>
CXCL8	Quimiocina com grupo C-X-C 8
CXCL10	Quimiocina com grupo C-X-C 10
DAMP	Padrão molecular associado a lesões celulares
DO	Densidade ótica
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogénica extraintestinal
FBS	Soro fetal bovino
Fe ³⁺	Ião férrico
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
g	Aceleração da gravidade
h	Hora
HAMR	Hemaglutinação manose-resistente
HAMS	Hemaglutinação manose-sensível
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HlyA	α-hemolisina
HQE	Hiperplasia Quística do Endométrio
IFN-γ	Interferão-γ
IGF-I	Fator semelhante à insulina-I
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IRF3	Fator de regulação do interferão 3
IRF7	Fator de regulação do interferão 7
LB	Lúria Bertani
LBP	Proteína de ligação ao LPS
LPS	Lipopolissacárido
mg	Miligrama
ml	Mililitro

mm	Milímetro
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NF- κ B	Fator nuclear- κ B
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
MOI	Multiplicidade de infeção
°C	Grau Celsius
OVH	Ovariohisterectomia
PAMP	Padrão molecular associado a agentes patogénicos
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRR	Recetor de reconhecimento de padrões
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TcpC	Proteína C que contém o domínio TIR
TGF- α	Fator de crescimento transformador- α
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
Th1	T <i>helper</i> tipo 1
TIR	Domínio homólogo ao do <i>Toll</i> /Recetor de IL-1
TIRAP	Proteína adaptadora que contém o domínio TIR
TLR	Recetor do tipo <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRAF6	Fator 6 associado ao recetor do TNF
TRAM	Proteína adaptadora relacionada com TRIF
TRIF	Proteína adaptadora que contém o domínio TIR, indutora de interferão- β
UFC	Unidades formadoras de colónias

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular decorreu entre Setembro de 2013 e Julho de 2014, no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) e no Laboratório de Reprodução e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL). Durante este estágio em Investigação Científica, foi desenvolvido o trabalho que constituiu a base da dissertação de mestrado integrado. Ao longo destes 11 meses adquiri conhecimentos numa área pouco explorada durante o curso de Medicina Veterinária. Foi com a colaboração da Professora Luísa Mateus, da Doutora Elisabete Silva, da Dr.^a Sofia Henriques (estudante de doutoramento) e da Engenheira Patrícia Diniz que aprendi diversas técnicas de laboratório. Adquiri conhecimentos e experiência em cultura de células, o que se revelou de extrema importância para o estabelecimento de culturas primárias de células epiteliais e do estroma, a partir do endométrio de cadelas submetidas a ovariectomia (OVH). Por outro lado, na área da bacteriologia executei algumas técnicas básicas de propagação de culturas bacterianas, em meio líquido e sólido, essenciais para os estudos de estimulação de culturas celulares com *E. coli*. Os conhecimentos adquiridos na área da biologia molecular foram também imprescindíveis para a execução do trabalho incluído na dissertação, envolvendo procedimentos de extração de ácido ribonucleico (ARN), síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (ADNc), reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, PCR convencional e eletroforese de produtos de PCR em géis de agarose. Neste estágio aprendi ainda técnicas de imunohistoquímica em cortes histológicos e de imunofluorescência em cultura de células.

I. PIÓMETRA

A piómetra consiste numa infecção bacteriana ao nível do útero, com subsequente acumulação de exsudado purulento, que ocorre durante a fase lútea do ciclo éstrico da cadela (Dow, 1958; Hagman, 2012; Harvey, 2004; Schlafer & Gifford, 2008). É uma doença do foro reprodutivo que afeta sobretudo fêmeas inteiras de meia-idade a geriátricas (England, 2009; Harvey, 2004; Johnston, Kustritz, & Olson, 2001). Está associada a sinais clínicos variados que refletem não só a inflamação local, como também alterações a nível sistémico, originadas essencialmente por bacteriémia e endotoxémia (Feldman & Nelson, 2004; Hagman, 2012; Mateus & Eilts, 2010).

1. Epidemiologia

A piómetra é uma doença frequente em cadelas inteiras, afetando quase 25% das fêmeas até aos 10 anos de idade (Egenvall *et al.*, 2001). A sua prevalência é superior nos países escandinavos, onde a OVH é realizada sobretudo por razões médicas, podendo atingir 50% nalgumas raças (Egenvall *et al.*, 2001; Hagman, 2004). A idade média de aparecimento desta doença varia entre os 7 e 9 anos (Dow, 1958; Fukuda, 2001; Gibson, Dean, Yates & Stavisky, 2013; Johnston *et al.*, 2001; Niskanen & Thrusfield, 1998). No entanto, estão descritos casos de piómetra em cadelas com idade compreendida entre os 4 meses e os 19 anos (Gibson *et al.*, 2013; Hagman, 2012; Niskanen & Thrusfield, 1998).

As raças Golden Retriever, Rough Collie, Cavalier King Charles Spaniel e Rotweiller são nomeadas por vários estudos como tendo um risco acrescido de desenvolver piómetra (Egenvall *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 2013; Niskanen & Thrusfield, 1998). Nalgumas delas a idade média de desenvolvimento desta afeção é mais precoce, o que pode indicar a existência de uma predisposição genética (Egenvall *et al.*, 2001). Esta predisposição pode derivar de alterações na secreção uterina, na contratilidade do miométrio ou na resposta imunitária local (Gibson *et al.*, 2013).

Dow (1957, 1958) observou há várias décadas atrás que a gestação assumia um carácter protetor face ao estabelecimento de piómetra. Desde então, vários autores apontam a nuliparidade como fator de risco para o estabelecimento da doença (Fukuda, 2001; Niskanen & Thrusfield, 1998; Smith, 2006; Verstegen, Dhaliwal, & Verstegen-Onclin, 2008). No entanto, a gestação não confere uma proteção total, uma vez que esta afeção também é diagnosticada em fêmeas múltiparas (Hagman, 2012). Contrariamente à gestação, a pseudogestação não parece ter

influência sobre a incidência de piómetra (Hagman, Lagerstedt, Hedhammar, & Egenvall, 2011; Johnston *et al.*, 2001; Mateus & Eilts, 2010).

A hiperplasia quística do endométrio (HQE) é um fator predisponente bastante importante para o desenvolvimento de piómetra (England, 2009; Hagman, 2012; Schlafer, 2012). A administração de hormonas esteróides exógenas, como o estrogénio e os progestagénios, também constitui um fator de risco (Barsanti, 2006; England, 2001; Johnston *et al.*, 2001; Pretzer, 2008).

2. Fisiopatologia

A fisiopatologia desta doença é complexa, refletindo uma interação entre diversos fatores etiológicos. Entre eles incluem-se a influência hormonal no ambiente uterino, alterações estruturais existentes no endométrio, como hiperplasia quística, o potencial de virulência da bactéria e a resposta imunitária uterina (Hagman, 2004; Mateus & Eilts, 2010). Na figura 1 estão representados os principais fatores envolvidos na fisiopatologia desta doença.

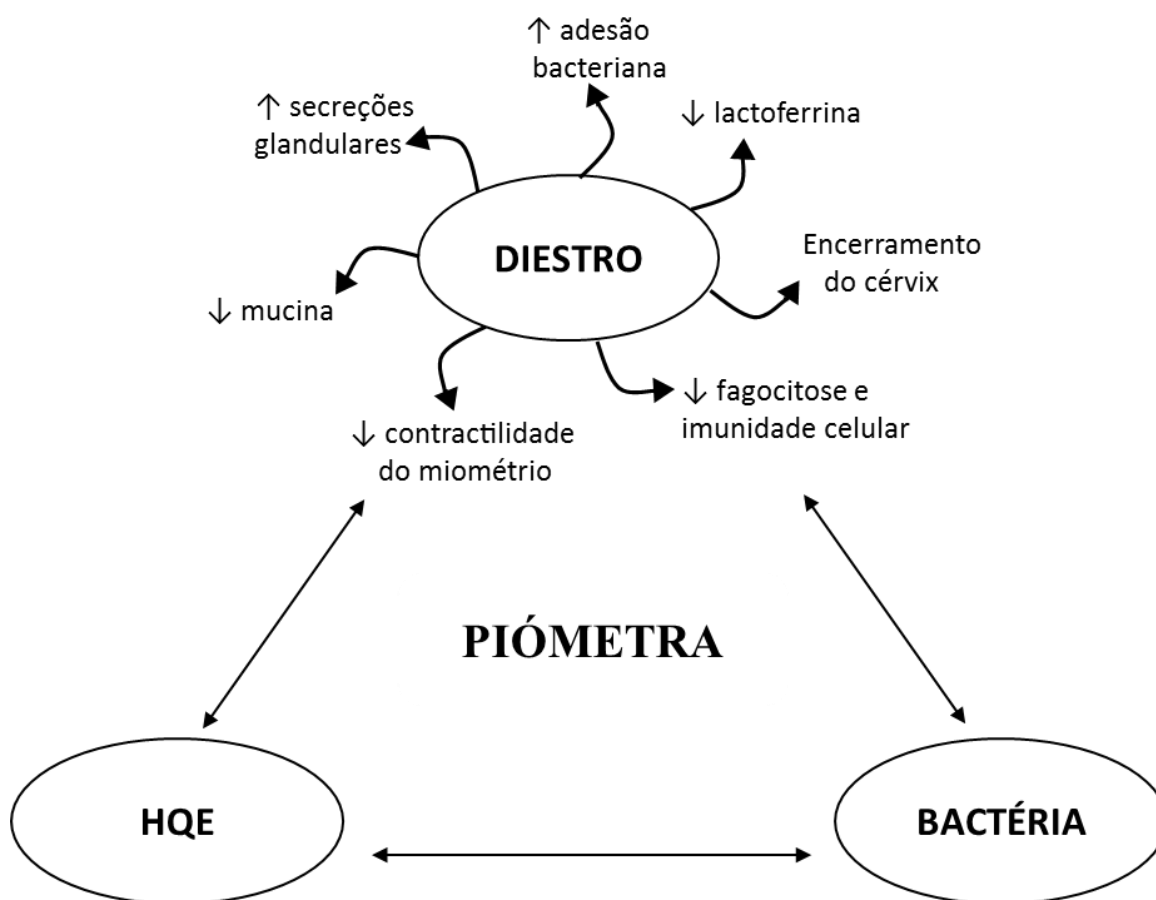


Figura 1 - Principais fatores envolvidos na fisiopatologia da piómetra na cadela

No diestro, concentrações elevadas de progesterona levam a que se reúnam condições propícias para a colonização bacteriana, que em conjunto com um elevado potencial de virulência da bactéria implicada podem levar ao estabelecimento de piómetra. Grande parte dos casos de piómetra está associada a uma situação pré-existente de hiperplasia quística do endométrio que atua como fator predisponente (Mateus & Eilts, 2010).

2.1 Fatores Hormonais

Tal como referido, a piómetra é uma alteração patológica característica da fase de diestro e a progesterona tem um papel fulcral na fisiopatologia da doença (Kempisty *et al.*, 2013; Pretzer, 2008; Smith, 2006). Esta hormona é responsável pela proliferação e secreção das glândulas endometriais, originando um ambiente propício ao crescimento bacteriano, e também pelo encerramento do cérvix e inibição da contratilidade do miométrio, o que impede a saída do conteúdo uterino. Para além destas ações, inibe a imunidade local uterina, facilitando assim o estabelecimento da infeção bacteriana (Feldman & Nelson, 2004; Johnston *et al.*, 2001; Kempisty *et al.*, 2013; Smith, 2006). Antagonicamente, o estrogénio é responsável por um relaxamento cervical e migração de neutrófilos para o lúmen uterino. A nível endometrial promove crescimento das glândulas, vascularização e edema (England, 2001; Johnston *et al.*, 2001; Kempisty *et al.*, 2013). Contudo, a administração de estrogénio, com a finalidade de interrupção da gestação, ou a manutenção de concentrações elevadas de estrogénio (no caso de quistos foliculares) numa altura em que a progesterona está elevada, está associada a um risco acrescido de desenvolvimento piómetra (Niskanen & Thrusfield, 1998; Smith, 2006). Isto ocorre devido a um prolongamento do período de patência do cérvix, o que facilita a contaminação ascendente do útero, e pelo facto dos estrogénios potenciarem a ação da progesterona ao aumentarem o número de recetores de progesterona no útero (Barsanti, 2006; Dhaliwal, England, & Noakes, 1999).

Assim, na primeira metade do diestro criam-se as condições ideais para a proliferação da bactéria.

2.1.1 Imunossupressão no diestro

No início da fase lútea, sob estimulação da progesterona, a atividade dos leucócitos mononucleares circulantes está diminuída (Sugiura *et al.*, 2004). O mesmo estudo demonstrou que a produção de interferão- γ (IFN- γ) diminui quando estas células são estimuladas *in vitro* com progesterona. Esta é uma citocina produzida principalmente pelos linfócitos T *helper* tipo I (Th1) com um papel importante na ativação da fagocitose. A inibição da sua produção pela

progesterona pode estar relacionada com a diminuição da resposta imunológica que ocorre no diestro (Sugiura *et al.*, 2004).

A diminuição da resposta imunitária permite que *Escherichia coli* colonize o útero da cadela com maior facilidade (Sugiura *et al.*, 2004). Após o estabelecimento da piómetra, a imunossupressão é agravada por uma diminuição da atividade linfocitária, possivelmente devido a endotoxémia, e por uma diminuição da capacidade fagocitária dos neutrófilos e monócitos (Faldyna, Laznicka & Toman, 2001).

Adicionalmente, no início do diestro há uma diminuição da transcrição e expressão do gene que codifica a mucina-1 (Muc1), o que poderá estar relacionado com aumento da adesão bacteriana ao endométrio da cadela (Ishiguro *et al.*, 2007). A mucina-1 constitui um importante mecanismo de defesa local, uma vez que dificulta o acesso das bactérias à superfície das células epiteliais luminais, onde estão localizados os recetores para as adesinas (Brayman, Thathiah & Carson, 2004). Também é no início do diestro que existe uma diminuição da produção de lactoferrina (Kida *et al.*, 2006), um antimicrobiano natural expresso pelas células epiteliais luminais e glandulares do endométrio (Kida *et al.*, 2006; King, Critchley & Kelly, 2003). De acordo com Yasunaga *et al.* (2013), a expressão de carboidratos, como manose e glucose, também varia ao longo do ciclo éstrico, observando-se um aumento durante o diestro, o que pode facilitar a adesão e a colonização bacteriana. Os resultados destes estudos são apoiados por um estudo *in vivo* que revela que a indução experimental de piómetra em cadelas, através de inoculação de *E. coli*, é superior no início do diestro (Tsumagari *et al.*, 2005).

2.2 Complexo Hiperplasia Quística do Endométrio - Piómetra

Há muito tempo que se reconhece a existência de uma relação entre HQE e piómetra, o que levou ao aparecimento da nomenclatura “complexo hiperplasia quística do endométrio - piómetra” (Dow, 1958, 1957; Schlafer & Gifford, 2008; Verstegen *et al.*, 2008). Assume-se que a hiperplasia endometrial ocorre em resposta a uma estimulação crónica e repetida de progesterona, tendo um desenvolvimento gradual e cumulativo ao longo de vários ciclos éstricos (Dow, 1958; England, 2009; Harvey, 2004; Johnston *et al.*, 2001; Mateus & Eilts, 2010). Tal facto é apoiado por uma maior incidência da doença em cadelas mais velhas (Feldman & Nelson, 2004). A cadela é particularmente suscetível a esta afeção dada a longa duração da fase lútea do ciclo éstrico, na qual o endométrio está predominantemente sob influência da progesterona (Johnston *et al.*, 2001; Schlafer, 2012).

A proliferação das glândulas endometriais, com ou sem formação de quistos, e a acumulação de secreções, predispõem a cadela ao desenvolvimento de piómetra (Hagman, 2012; Schlafer

& Gifford, 2008; Schlafer, 2012). No entanto, nem todos os animais com HQE desenvolvem piómetra, do mesmo modo que alguns animais relativamente jovens sem evidência de HQE também desenvolvem piómetra (De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch, Van Den Broeck, & Coryn, 2001; Feldman & Nelson, 2004; Verstegen *et al.*, 2008).

Alguns autores sugerem que uma infecção bacteriana subclínica ao progredir lentamente pode conduzir a hiperplasia e hipertrofia do endométrio através da sua estimulação durante a fase lútea, de modo semelhante ao que ocorre no período de implantação do embrião (Schlafer & Gifford, 2008; Verstegen *et al.*, 2008). Estes estudos levam a crer que nem sempre a piómetra ocorre secundariamente a HQE e que a sequência de eventos pode ser inversa (Verstegen *et al.*, 2008). De Bosschere *et al.* (2001) consideram que piómetra e hiperplasia quística do endométrio são entidades distintas, a nível clínico e anatomopatológico, e independentes. No entanto não se exclui o facto de HQE predispor ao desenvolvimento piómetra.

Durante a fase de diestro o endométrio canino está muito sensível a estímulos não-hormonais (Schlafer & Gifford, 2008), que são capazes de induzir uma hiperplasia quística do endométrio, de aparência histológica semelhante à de ocorrência espontânea (De Bosschere, Ducatelle, & Tshamala, 2002; Johnston *et al.*, 2001)

2.2.1 Alterações na expressão de recetores hormonais e de fatores de crescimento

Durante a fase lútea, a concentração de progesterona sérica não varia significativamente entre animais com e sem hiperplasia quística do endométrio (England, 2009; Johnston *et al.*, 2001; Schlafer & Gifford, 2008; Ververidis *et al.*, 2004). Nos casos de hiperplasia quística do endométrio, os recetores de estrogénio e progesterona estão presentes em número significativamente superior em comparação com úteros normais (De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch, Simoens & Coryn, 2002; De Cock, Vermeirsch, Ducatelle & De Schepper, 1997). Especula-se que nestes animais existe uma falha na diminuição da expressão dos recetores de estrogénio face a concentrações crescentes de progesterona, o que pode estimular uma proliferação contínua das glândulas, explicando as alterações histopatológicas características desta afeção (De Cock *et al.*, 1997). Pelo contrário, em cadelas com piómetra ambos os tipos de recetores estão diminuídos em número, exceto no epitélio glandular onde existe uma sobre-expressão de recetores de progesterona (De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch *et al.*, 2002; De Bosschere, Ducatelle & Tshamala, 2003). Crê-se que estes recetores estão indiretamente envolvidos na patogénese destas duas entidades clínicas (De Bosschere, Ducatelle, Vermeirsch *et al.*, 2002). No entanto, Ververidis *et al.* (2004) apresentaram resultados contraditórios, revelando uma diminuição da expressão de ambos os recetores no complexo HQE/piómetra.

Quer a estimulação não hormonal (Dhaliwal, England, & Noakes, 2002), quer a administração exógena de hormonas esteróides levam a uma alteração na expressão dos recetores hormonais (De Bosschere, Ducatelle, Tshamala, & Coryn, 2002).

Julga-se que alguns fatores de crescimento também possam estar envolvidos na fisiopatologia do complexo hiperplasia quística do endométrio-piômetra (De Cock, Ducatelle, Tilmant, & De Schepper, 2002; Kida *et al.*, 2010). Os fatores de crescimento possuem a capacidade de estimular a proliferação celular e inibir a apoptose celular (Kempisty *et al.*, 2013). Entre eles inclui-se o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), um importante fator com ação mitogénica, cuja expressão nas células epiteliais e do estroma se encontra aumentada nesta doença (De Cock *et al.*, 2002). De acordo com Kida *et al.* (2010), o aumento da produção de fator de crescimento transformador- α (TGF- α) principalmente pelas células de reação inflamatória e a baixa expressão de fator de crescimento epidérmico (EGF), um fator regulador da regressão das glândulas endometriais, parecem desempenhar um papel relevante no desenvolvimento de piômetra.

2.3 Agentes infecciosos

E. coli é a bactéria mais frequentemente isolada a partir dos úteros de cadelas com piômetra, no entanto podem estar envolvidas outras bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. (Barsanti, 2006; Verstegen *et al.*, 2008). A patência cervical durante as fases de proestro e estro permite a contaminação ascendente do útero por bactérias presentes na vagina (Watts, Wright & Whithear, 1996). Estas podem causar infeção no diestro, quando estão reunidas condições propícias para a sua proliferação (Feldman & Nelson, 2004). As estirpes de *E. coli* associadas a piômetra provêm da flora fecal do animal e não de um clone específico disseminado entre animais (Hagman & Kühn, 2002; Mateus *et al.*, 2013; Wadas, Kühn, Lagerstedt, & Jonsson, 1996).

A maioria das estirpes isoladas de úteros de cadelas com piômetra pertencem ao grupo filogenético B2 e possuem um vasto arsenal de genes que codificam para fatores de virulência (Henriques, Silva, Lemsaddek, Lopes-da-Costa, & Mateus, 2014; Mateus *et al.*, 2013). No que diz respeito a determinantes de virulência, as estirpes isoladas de úteros de cadelas com piômetra são muito parecidas com as estirpes uropatogénicas, o que sugere que determinados fatores de virulência implicados nas infeções do trato urinário conferem também vantagem à bactéria na infeção do útero (Chen, Wright, Lee, & Browning, 2003; Mateus *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2009).

II. *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli é uma bactéria comum do trato gastrointestinal de humanos e animais, fazendo parte da sua microbiota (Bélanger *et al.*, 2011; Bien, Sokolova, & Bozko, 2012; Siqueira *et al.*, 2009). É um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, que pertence à família *Enterobacteriaceae* (Hirsh, 2003; Sousa, 2006).

De um modo geral, as estirpes de *E. coli* podem classificar-se em três grandes grupos, com base em critérios genéticos e clínicos: as estirpes comensais, inofensivas para o hospedeiro, as estirpes patogênicas intestinais e as patogênicas extraintestinais (ExPEC) (Russo & Johnson, 2000). As estirpes isoladas de úteros de cadelas com piômetra incluem-se neste último grupo. As ExPEC mantêm a capacidade de colonizar o intestino, tal como as estirpes comensais, e adicionalmente conseguem provocar infecção noutros nichos do hospedeiro (Bien *et al.*, 2012; Köhler & Dobrindt, 2011; Wiles, Kulesus, & Mulvey, 2008). Esta aptidão que as ExPEC têm para colonizar, invadir e causar doença extraintestinal deve-se à aquisição de fatores de virulência específicos (Emödy, Kerényi, & Nagy, 2003; Kaper, Nataro & Mobley, 2004).

O estabelecimento da infecção bacteriana que está na origem da piômetra é um processo complexo composto por várias fases. Requer adesão às células do hospedeiro, colonização dos tecidos, invasão e destruição celular (Bien *et al.*, 2012; Mims, Nash, & Stephen, 2001) (Figura 2).

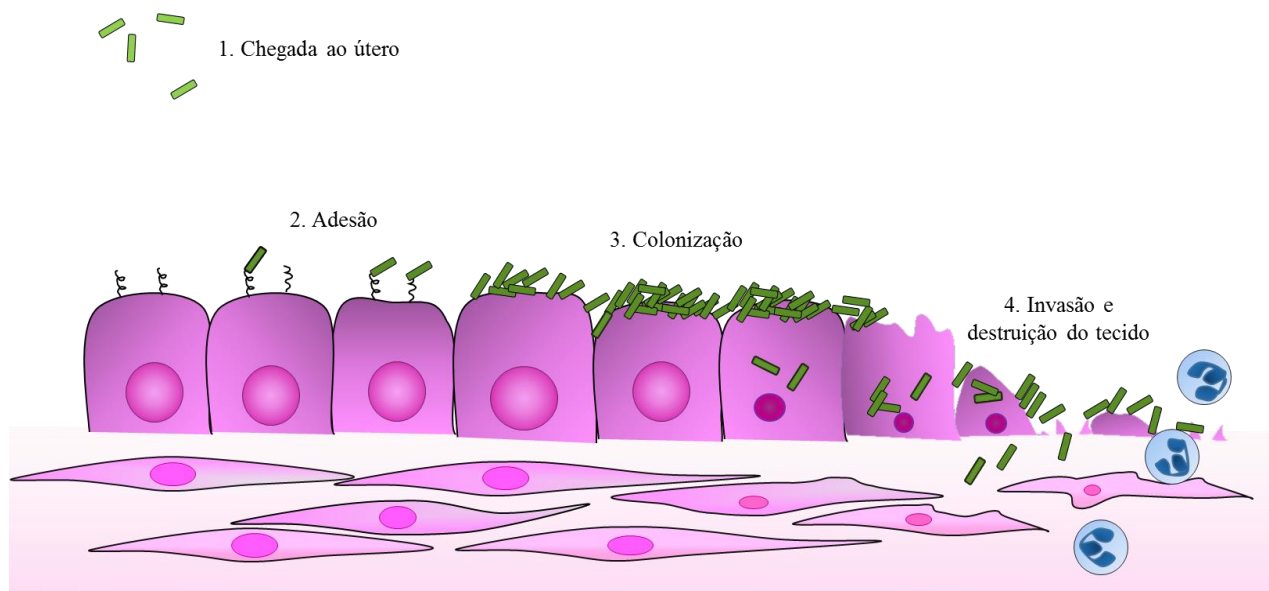


Figura 2 - Principais etapas envolvidas no estabelecimento da infecção bacteriana

Em cada uma destas etapas intervêm diferentes fatores de virulência os quais serão abordados de seguida.

1. Fatores de Virulência

Os genes que codificam para os fatores de virulência das bactérias patogênicas podem estar localizados no cromossoma bacteriano, ou em elementos genéticos móveis como plasmídeos, genoma de bacteriófagos ou transposões (Kaizer, Bienz, Eckert, & Zinkernagel, 2005; Prescott, Harley & Klein, 2002). Estes genes associados a virulência estão frequentemente agrupados em grandes blocos de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico, denominados ilhas de patogenicidade, que podem ser adquiridos por transferência horizontal (Mateus *et al.*, 2013; Oelschlaeger, Dobrindt & Hacker, 2002). Embora os fatores de virulência estejam codificados no genoma, a sua expressão é seletivamente regulada para que sejam sintetizados apenas quando e onde for necessário, o que evita que a bactéria despenda energia de forma pouco vantajosa (Emödy *et al.*, 2003). De um modo geral, a virulência da bactéria é o resultado do impacto cumulativo de vários fatores de virulência relacionados com a adesão bacteriana, invasão, captação de ferro e subversão das defesas do hospedeiro (Bélangier *et al.*, 2011; Dobrindt & Hacker, 2008; Johnson, 1991).

1.1 Lipopolissacárido

O lipopolissacárido (LPS), constituinte da parede celular de bactérias Gram-negativas, constitui um importante fator de virulência de *E. coli* (Emödy *et al.*, 2003). Esta molécula é composta por três componentes estruturalmente distintos: um núcleo oligossacarídico, o lípido A ou endotoxina, e uma cadeia polissacarídica conhecida como antígeno O (Raetz & Whitfield, 2002; Willis & Whitfield, 2013). A endotoxina bacteriana é libertada após a morte e desintegração bacteriana (Feldman & Nelson, 2004). A estrutura molecular conservada do lípido A é reconhecida por recetores específicos nas células do hospedeiro que estão envolvidos na resposta imunitária inata. Após a ligação a recetores, o lípido A induz a síntese de diversos mediadores da inflamação e de moléculas co-estimuladoras envolvidas na resposta imunitária adaptativa, atuando como um potente indutor da resposta inflamatória (Raetz & Whitfield, 2002; Willis & Whitfield, 2013). Por outro lado, o LPS também causa um aumento na permeabilidade das junções existentes entre células epiteliais e endoteliais, facilitando assim a translocação bacteriana (Willis & Whitfield, 2013). A endotoxémia resultante é responsável pelos sinais clínicos normalmente observados nos casos de piómetra (Feldman & Nelson, 2004; Mateus & Eilts, 2010).

1.2 Adesinas

A adesão é um processo fundamental para o estabelecimento da infecção bacteriana (Brito, Vidotto, Berbel, & Tagliari 2004; Johnson, 1991; Le Bouguénec, 2005). Pode ser mediada por vários tipos de adesinas, maioritariamente de estrutura fimbrial, que promovem a ligação específica de *E. coli* a recetores existentes na superfície das células do hospedeiro (Bien *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2004; Emödy *et al.*, 2003).

As fimbrias são estruturas filamentosas que estão ancoradas à membrana externa da bactéria (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2006). Para além de desempenharem um papel fulcral na ligação da bactéria à célula do hospedeiro, também despoletam vias de sinalização intracelular, facilitam o contacto de produtos produzidos pelas bactérias, como as toxinas, com as células do hospedeiro e promovem a invasão bacteriana (Bien *et al.*, 2012; Le Bouguénec, 2005; Mulvey, 2002). Tendo em conta a sua capacidade de aglutinar eritrócitos, as fimbrias de *E. coli* podem ser classificadas em manose-sensíveis (HAMS), quando a hemaglutinação é inibida pela manose, manose-resistentes (HAMR), quando a hemaglutinação não é inibida pela manose, ou não hemaglutinantes, quando não ocorre reação de aglutinação (Brito *et al.*, 2004).

As fimbrias tipo 1 são classificadas como HAMS (Johnson, 1991). A adesão mediada por estas fimbrias pode ser bloqueada com recurso a D-manose, concavalina A ou α -metilmanósido (Brito *et al.*, 2004; Johnson, 1991). Este tipo de fimbria é expressa não só por estirpes patogénicas extraintestinais como também por comensais e medeia ligação a recetores glicoproteicos contendo moléculas de manose (Bien *et al.*, 2012; Guyer, Gunther IV, & Mobley, 2001; Mulvey, 2002). Krekeler *et al.* (2012) demonstraram que a adesão de *E. coli* ao endométrio canino é facilitada por fimbrias tipo 1. Para além dos genes que codificam fimbrias tipo 1, os genes que codificam as fimbrias P e F1C estão entre os mais frequentemente detetados no genoma de isolados de *E. coli* associados a piómetra (Henriques *et al.*, 2014; Mateus *et al.*, 2013). As fimbrias P expressam-se fenotipicamente como HAMR e os seus recetores são glicolípidos com um digalactósido Gal(α -1-4)Gal, presentes em diversos tipos de células (Johnson, 1991; Mulvey, 2002). As fimbrias F1C não são hemaglutinantes (Klemm, Ørskov, & Ørskov, 1982) e medeiam a ligação a glicosfingolípidos existentes no trato urinário (Bäckhed *et al.*, 2002). Não se conhece o papel das fimbrias P e F1C na adesão ao endométrio da cadela. Um estudo recente mostrou que *E. coli* é capaz de compensar plenamente a deleção de um ou dois de três genes que codificam adesinas (*fimH*, *papGIII* e *sfa*), sem apresentar uma redução da adesão ao endométrio da cadela, o que evidencia uma situação de redundância funcional (Krekeler *et al.*, 2013). Todas estas fimbrias são também capazes de se ligar a componentes da matriz extracelular, o que facilita a invasão do tecido pela bactéria (Emödy *et al.*, 2003). A

síntese de fimbrias é um processo que exige um grande dispêndio de energia, o que justifica que seja estritamente regulada. A expressão de fimbrias pode ser regulada por estímulos ambientais como temperatura, oxigenação, osmolaridade, pH e disponibilidade de nutrientes que alteram o promotor da fimbria para um estado *on* (ocorre transcrição dos genes) ou *off* (a transcrição dos genes está silenciada). O mecanismo de alteração reversível do estado *on* para *off* e vice-versa é conhecido como variação de fase (Johnson, 1991; Mulvey, 2002).

1.3 Sistemas de captação de ferro

Após a adesão, a bactéria deve replicar-se para evitar que seja rapidamente eliminada (Quinn, Markey, Carter, Donnelly, & Leonard, 2002). Para proceder à colonização, a *E. coli* necessita de nutrientes essenciais para a sua proliferação (Prescott *et al.*, 2002).

O ferro é um fator limitante para a multiplicação bacteriana no hospedeiro. É essencial para diversos processos celulares como transporte de eletrões, síntese de ADN, transporte de oxigénio e metabolismo de peróxidos (Johnson, 1991; Brito *et al.*, 2004). Tal como no útero, a maioria dos órgãos tem uma quantidade de ferro livre disponível muito menor do que aquela que é requerida para as bactérias se multiplicarem e causarem doença (Skaar, 2010). Isto levou a que as bactérias desenvolvessem mecanismos para a aquisição de ferro, que no hospedeiro se encontra na sua maioria ligado a proteínas tais como a hemoglobina, a ferritina, a lactoferrina ou a transferrina (Braun & Killmann, 1999; Hirsh, 2003; Ratledge & Dover, 2000). As bactérias sintetizam e libertam para o meio envolvente substâncias denominadas sideróforos que se ligam com elevada afinidade ao ião férrico (Fe^{3+}). Posteriormente o complexo ferro-sideróforo é internalizado pela bactéria através de recetores específicos (Andrews, Robinson, & Rodríguez-Quíñones, 2003; Wandersman & Delepelaire, 2004; Wiles *et al.*, 2008). Para além dos sideróforos, a *E. coli* pode possuir outros sistemas de captação de ferro como o recetor ChuA, presente na membrana externa, que se liga ao grupo heme (Emödy *et al.*, 2003). Tal como observado em *E. coli* de outras origens, a presença de diversos genes que codificam diferentes sistemas de aquisição de ferro no genoma das estirpes de *E. coli* isoladas de cadelas com piómetra pode indicar que existe redundância funcional e/ou que conferem uma vantagem para a sobrevivência e persistência da bactéria no ambiente uterino (Henriques *et al.*, 2014; Mateus *et al.*, 2013).

1.4 Toxinas

As toxinas produzidas por estirpes de *E. coli* isoladas de cadelas com piómetra são representadas principalmente pela α -hemolisina (HlyA) e pelo fator citotóxico necrosante 1 (CNF1), que contribuem para a destruição do tecido uterino (Siqueira *et al.*, 2009). Os genes que codificam estas toxinas (*hlyA* e *cnf1*, respetivamente) apresentam uma elevada prevalência em isolados de cadelas com piómetra (Chen *et al.*, 2003; Henriques *et al.*, 2014; Mateus *et al.*, 2013). Isto sugere que estes dois fatores de virulência podem ter um efeito sinérgico vantajoso para a bactéria (Boquet, 2001).

1.4.1 Fator Citotóxico Necrosante 1

O CNF1 foi descrito pela primeira vez na década de 80 como uma toxina que em cultura celular originava células multinucleadas (“citotóxico”) e necrose quando administrada na pele de coelho (“necrosante”) (Boquet, 2001; Brito *et al.*, 2004; Fabbri, Travaglione, & Fiorentini, 2010). O CNF1 ativa permanentemente as Rho GTPases, que estão envolvidas na regulação da organização e dinâmica do citoesqueleto de actina das células eucarióticas (Boquet, 2001; Fiorentini *et al.*, 1997). A sua ação sobre estas proteínas leva a uma reorganização do citoesqueleto de actina nas células epiteliais (Fabbri *et al.*, 2010), com consequências várias. O CNF1 estimula a formação de fibras de *stress* de actina e provoca um pregueamento da membrana celular (Bien *et al.*, 2012; Fiorentini *et al.*, 1997). Estas ações induzem uma fagocitose inespecífica por células como as células epiteliais, que se tornam capazes de fagocitar bactérias e materiais como partículas de latex, através de um mecanismo denominado de macropinocitose (Fabbri *et al.*, 2010; Falzano *et al.*, 1993; Fiorentini *et al.*, 1997). Por outro lado, originam células multinucleadas devido ao efeito inibitório na citocinese (Fabbri *et al.*, 2010; Mills, Meysick, & O’Brien, 2000). Estão também descritas atividades sobre o ciclo celular como a inibição (Fiorentini *et al.*, 1997) ou a indução de apoptose (Mills *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 2005) em diferentes tipos celulares. O CNF1 também pode provocar um aumento da adesão ao epitélio e diminuição da atividade fagocitária dos polimorfonucleares neutrófilos (Boquet, 2001). Alguns destes mecanismos de ação podem ser importantes para a adesão e internalização da bactéria nas células, multiplicação intracelular e posterior transcitose de forma a infectar camadas celulares mais profundas (Fiorentini *et al.*, 1997).

1.4.2 α -hemolisina

A α -hemolisina é uma exotoxina que contribui para a virulência de estirpes de ExPEC (Emödy *et al.*, 2003; Goñi & Ostolaza, 1998). Embora a sua designação provenha da capacidade de lisar eritrócitos, a hemolisina atua num espectro mais amplo de células, incluindo células de reação inflamatória e as células constituintes do tecido (Cavalieri, Bohach, & Snyder, 1984; Emody *et al.*, 2003; Goñi & Ostolaza, 1998; Jonas, Schultheis, Klas, Krammer, & Bhakdi, 1993). Esta toxina tem uma atividade dupla dependente da concentração. Em concentrações elevadas insere-se na membrana dos eritrócitos e células nucleadas do hospedeiro formando poros e causando morte celular. Em concentrações sublíticas a oscilação da concentração de cálcio intracelular afeta as vias de transdução de sinal nas células do hospedeiro e pode induzir apoptose (Bien *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2005; Spurbeck & Mobley, 2013; Wiles *et al.*, 2008). A hemolisina pode estar envolvida na patogénese da piómetra pelo menos de três formas distintas. A sua capacidade hemolítica aumenta a quantidade de ferro disponível para ser assimilado pela bactéria, promovendo assim a sobrevivência e a multiplicação bacteriana. Por outro lado, é citotóxica para granulócitos e linfócitos, o que favorece a sobrevivência do microrganismo por inibir os mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, esta toxina atua nas células do estroma e parênquima do órgão, contribuindo para a destruição do tecido, facilitando assim a invasão bacteriana (Cavalieri *et al.*, 1984; Johnson, 1991).

1.5 Evasão das defesas do hospedeiro

As bactérias patogénicas desenvolveram vários mecanismos para escapar às defesas do hospedeiro (Yadav *et al.*, 2010). A cápsula reveste a célula bacteriana, protegendo-a da fagocitose por células do hospedeiro e da atividade bactericida do complemento (Bien *et al.*, 2012; Hirsh, 2003; Miajlovic & Smith, 2014). *E. coli* pode ainda possuir outros mecanismos de resistência ao complemento codificados em plasmídeos, como o TraT, uma lipoproteína da membrana externa que, tal como a cápsula, confere vantagem à bactéria em situação de bacteriémia (Miajlovic & Smith, 2014). De forma a subverter as defesas do hospedeiro as ExPEC podem ainda produzir um fator de virulência, designado de proteína C que contém o domínio TIR (TcpC), que interfere com a ativação da via de sinalização intracelular dos recetores do tipo *Toll*, os quais constituem um importante componente da resposta imunitária inata (Cirl *et al.*, 2008; Patterson & Werling, 2013; Schubert *et al.*, 2010). Assim, através da síntese de TcpC, é inibida a produção de citocinas importantes para o desencadear de uma resposta imunitária que vise a eliminação bacteriana (Yadav *et al.*, 2010).

III. IMUNIDADE NO ÚTERO

No útero, a imunidade envolve alguma especialização dado o seu envolvimento não só na eliminação de agentes patogénicos, como também na fertilização, implantação, tolerância imunológica dos fetos e manutenção da gestação até ao parto (Horne, Stock, & King, 2008; Turner, Healey, & Sheldon, 2012).

Esta imunidade assenta em dois principais tipos de mecanismos: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa (Amjadi, Salehi, Mehdizadeh, & Aflatoonian, 2014). A imunidade inata envolve respostas não específicas, mais rápidas e primitivas do que a imunidade adaptativa, constituindo a primeira linha de defesa que contribui para a eliminação do agente patogénico (Kawai & Akira, 2006; Medzhitov, 2001; Werling & Jungi, 2003). Na resposta imunitária inata estão envolvidas barreiras físicas, como a barreira epitelial da mucosa uterina, a secreção de péptidos antimicrobianos, o sistema complemento e as células envolvidas na deteção e resposta contra agentes patogénicos (Amjadi *et al.*, 2014; Turner *et al.*, 2012).

Os agentes infecciosos são reconhecidos após a ligação de componentes específicos dos microrganismos, os padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMPs), a recetores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células do hospedeiro (Akira, Takeda, & Kaisho, 2001; Beutler, 2004; Kannaki, Shanmugam, & Verma, 2011). Os PRRs mais descritos no trato reprodutivo da cadela são os recetores do tipo *Toll* (TLRs) (Chotimanukul & Sirivaidyapong, 2011; Silva *et al.*, 2010, 2012).

1. Recetores do tipo *Toll*

Os TLRs são proteínas transmembranares contendo um domínio extracelular, com repetições ricas em leucina, que medeia a sua ligação a PAMPs, e um domínio intracelular homólogo ao do *Toll*/recetor de IL-1 (TIR) necessário para a ativação de uma cascata de sinalização, que culmina na produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e interferões do tipo I (Kannaki *et al.*, 2011; Kawai & Akira, 2010, 2011; Medzhitov, 2001).

Com base na localização celular os recetores do tipo *Toll* podem ser divididos em dois sub-grupos. Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 são expressos à superfície da célula e reconhecem fundamentalmente componentes externos da bactéria. Em oposição, os TLRs 3, 7, 8 e 9 localizam-se em vesículas intracelulares e são responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucleicos dos agentes patogénicos (Kawai & Akira, 2011; Takeda & Akira, 2005).

Silva *et al.* (2012) demonstraram a transcrição de 8 membros da família dos TLRs (TLR1 a 7 e TLR9) no endométrio da cadela, revelando que estes recetores podem ter um papel importante na vigilância imunitária no útero. Cada membro da família dos TLRs reconhece ligandos

diferentes (Kawai & Akira, 2011), o que indica que o endométrio tem a capacidade de reconhecer um espectro alargado de PAMPs e de orquestrar uma resposta imunitária contra uma grande variedade de agentes patogénicos (Silva *et al.*, 2012).

O TLR2 reconhece um espectro alargado de PAMPs, dos quais se destacam o ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas e o peptidoglicano e lipoproteínas/lipopéptidos presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Aliprantis *et al.*, 1999; Schwandner, Dziarski, Wesche, Rothe, & Kirschning, 1999). A capacidade de ser ativado por uma ampla variedade de moléculas está relacionada com o facto de formar heterodímeros com os recetores TLR6 ou TLR1, o que dita a especificidade de reconhecimento de ligandos (Beutler, 2004; Zähringer, Lindner, Inamura, Heine, & Alexander, 2008).

O TLR4 foi o primeiro membro da família dos recetores tipo *Toll* a ser identificado e é um dos mais bem estudados (Jungi, Farhat, Burgener, & Werling, 2011; Turner *et al.*, 2012). Em cooperação com as proteínas CD14, MD-2 e a proteína de ligação ao LPS (LBP) deteta o lipopolissacárido (Poltorak *et al.*, 1998; Kawai & Akira, 2010). Este TLR também reconhece ligandos endógenos como as proteínas de choque térmico (Fang *et al.*, 2011).

A flagelina, proteína constituinte do flagelo bacteriano, é reconhecida pelo TLR5 (Gewirtz, Navas, Lyons, Godowski, & Madara, 2001; Hayashi *et al.*, 2001). Os TLR 7 e 8 estão envolvidos na resposta imunitária contra infeções virais, sendo responsáveis pela deteção de ácido ribonucleico (ARN) viral de cadeia simples (Triantafyllou *et al.*, 2005), enquanto que o TLR3 reconhece ARN de cadeia dupla (Alexopoulou, Holt, Medzhitov, & Flavell, 2001). O TLR 9 está envolvido na resposta a ADN não metilado rico em CpG, presente em bactérias e vírus, mas raro nos vertebrados (Hemmi *et al.*, 2000; Takeshita *et al.*, 2001; Wagner, 2002).

Os TLRs são expressos não só pelas células de reação inflamatória, mas também pelas células epiteliais e pelos fibroblastos constituintes do estroma (Chotimanukul & Sirivaidyapong, 2011; Silva *et al.*, 2012; Turner *et al.*, 2012). As células epiteliais e os fibroblastos poderão desempenhar um papel de sentinelas no útero, produzindo citocinas e quimiocinas para alertar e ativar as células hematopoiéticas após um primeiro contacto com os microrganismos (Amjadi *et al.*, 2014; Turner *et al.*, 2012).

Ao nível do útero, a transcrição e a expressão de TLRs são dependentes da fase do ciclo éstrico, uma vez que são diretamente influenciadas pelas hormonas ováricas (García-Gómez, González-Pedrajo, & Camacho-Arroyo, 2013; Kannaki *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012). Quando comparado com outras fases do ciclo éstrico, o endométrio de cadela na primeira metade do diestro apresenta níveis baixos de transcrição e expressão de TLR2 e TLR4. Este facto pode ser um mecanismo fisiológico para facilitar a implantação do embrião, diminuindo a resposta

inflamatória. No entanto, pode comprometer as defesas antimicrobianas e estar relacionado com a elevada prevalência de piómetra nesta fase do ciclo éstrico (Silva *et al.*, 2012).

A transcrição e a expressão de TLR2 e TLR4 estão aumentadas no endométrio de úteros de cadelas com piómetra, o que em parte poderá refletir a intensa infiltração por células de reação inflamatória no estroma e glândulas endometriais (Silva *et al.*, 2010). Chotimanukul e Sirivaidyapong (2011) descrevem um aumento da expressão de TLR4 no epitélio superficial e no estroma endometrial em úteros com piómetra, quando comparados com úteros de diestro não patológico. Estes estudos evidenciam o envolvimento destes dois membros da família dos TLRs na resposta imunitária uterina numa situação de piómetra. No entanto os TLR1, TLR2, TLR5, TLR6 e TLR9 também poderão estar envolvidos no reconhecimento de componentes de bactérias Gram-negativas, como *E. coli*.

1.1 Via de sinalização dos recetores do tipo *Toll*

Após a ligação do PAMP ao TLR ocorre dimerização dos seus domínios extracelulares e o domínio TIR é ativado (O'Neill, Golenbock, & Bowie, 2013; Song & Lee, 2012). Podem ser despoletados dois tipos de vias de sinalização intracelular, dependendo das proteínas adaptadoras recrutadas (Kannaki *et al.*, 2011; Medzhitov, 2001). A via dependente da proteína adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) é comum a todos os TLRs, com exceção do TLR3. Esta via culmina na transcrição de citocinas inflamatórias, após a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) por fosforilação e a sua translocação para o núcleo da célula. A via alternativa é a via dependente da proteína adaptadora que contém o domínio TIR, indutora de interferão- β (TRIF), a qual é despoletada após a ativação dos TLRs 3 ou 4, resultando na fosforilação dos fatores de transcrição NF- κ B (ativação tardia) e fator de regulação do interferão 3 (IRF3). Estes fatores ativados são translocados para o núcleo, onde promovem a transcrição de interferão tipo I, quimiocinas e citocinas inflamatórias (Amjadi *et al.*, 2014; Kumar, Kawai, & Akira, 2011; Uematsu & Akira, 2006).

Adicionalmente, a proteína adaptadora que contém o domínio TIR (TIRAP) é necessária para o recrutamento de MyD88 após a ativação dos TLR2 e 4. Para a ativação da via independente de MyD88, o TLR4 necessita da molécula adaptadora relacionada com TRIF (TRAM) para interagir com TRIF (Kawai & Akira, 2010; Qian & Cao, 2013). Na figura 3 estão representadas as vias de sinalização despoletadas pelos TLRs envolvidos na resposta a componentes de bactérias Gram-negativas e os respetivos ligandos.

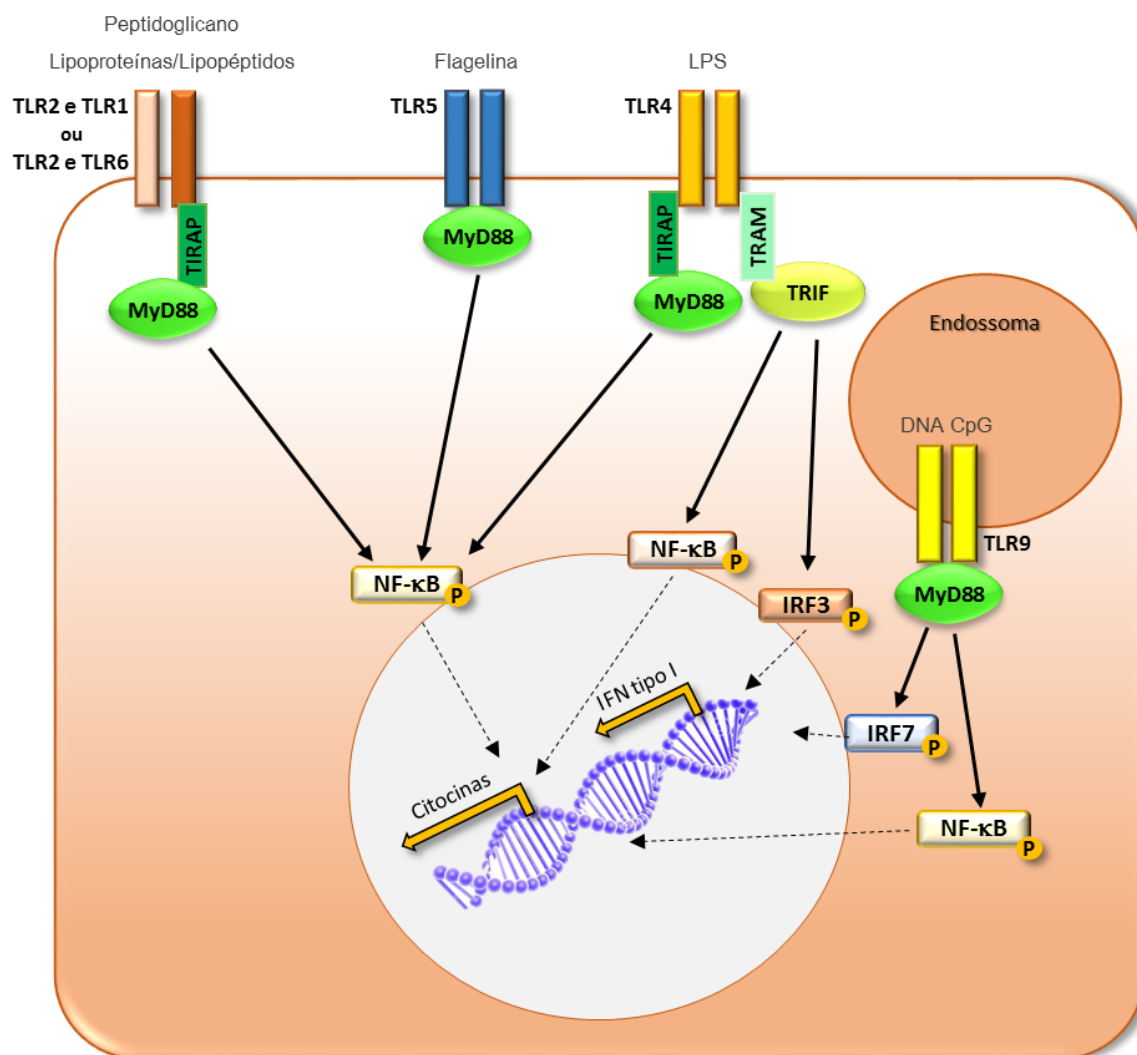


Figura 3 - Vias de sinalização dos TLRs envolvidos no reconhecimento de componentes de bactérias Gram-negativas e respectivos ligandos.

O TLR4 é o único TLR que utiliza as quatro proteínas adaptadoras e que é capaz de ativar ambas as vias de sinalização. Numa primeira fase há ativação da via dependente de MyD88 e posteriormente ocorre internalização do complexo TLR-ligando, iniciando-se uma cascata de sinalização intracelular dependente de TRIF (Kawai & Akira, 2010, 2011; Kumar *et al.*, 2011). Os componentes das vias dependente de MyD88 (MyD88, Fator 6 associado ao recetor do TNF - TRAF6, NF-κB) e dependente de TRIF mediada por IRF3 (TRAM, TRIF, IRF3) são constitutivamente transcritos no endométrio da cadela, não havendo diferença entre o diestro sem afeção uterina e a piómetra (Carvalho, 2014).

A ativação do TLR9 pode induzir a transcrição de interferões do tipo I de uma forma dependente de MyD88 através da ativação do fator de regulação do interferão 7 (IRF7) (Monroe, McWhirter, & Vance, 2010; Uematsu & Akira, 2006).

A via de sinalização dos recetores do tipo *Toll* estabelece uma ponte entre a resposta imunitária inata e a resposta imunitária adquirida através da produção de citocinas e quimiocinas (Aflatoonian & Fazeli, 2008; Pasare & Medzhitov, 2004; Werling & Jungi, 2003). As citocinas e quimiocinas secretadas facilitam a comunicação entre diferentes tipos de células e criam um ambiente hostil para a sobrevivência do microrganismo invasor (Amjadi *et al.*, 2014).

1.2 Efetores: citocinas e quimiocinas

As citocinas são proteínas que intervêm na organização da resposta inflamatória, atuando principalmente sobre as células hematopoiéticas de forma a promover a eliminação do agente patogénico (Kawai & Akira, 2001; Tizard, 2013). Após a sua ligação ao recetor na célula alvo, conduzem a uma alteração no comportamento celular, induzindo a célula a proliferar, diferenciar-se ou a produzir determinadas proteínas (Tizard, 2013). Normalmente atuam sobre a própria célula, de forma autócrina, ou nas células vizinhas, por ação parácrina. Nalgumas situações podem também atuar à distância, por ação endócrina (O'Shea, Gadina, & Siegel, 2013; Roitt & Delves, 2001). Das citocinas fazem parte as interleucinas, os interferões e as quimiocinas (Tizard, 2013). De acordo com a sua atividade, as citocinas são comumente divididas em dois grandes grupos, as citocinas pró-inflamatórias e as anti-inflamatórias (Dinarello, 2000). Tal como a denominação indica, as primeiras são caracterizadas pela sua capacidade de promover a inflamação, e são de destacar a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6) como fazendo parte das citocinas mais importantes deste grupo. De um modo geral, estas atuam induzindo a proliferação e ativação de células de reação inflamatória e estimulam a síntese de outras citocinas e quimiocinas (O'Shea *et al.*, 2013). Em oposição, as citocinas anti-inflamatórias estão envolvidas na supressão da atividade das citocinas pró-inflamatórias, diminuindo assim a intensidade da resposta inflamatória (Sultani, Stringer, Bowen & Gibson, 2000). A interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) são dois importantes exemplos deste tipo de citocinas, apresentando um papel imunomodulador através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, da apresentação antigénica e da proliferação e ativação de determinadas células de resposta inflamatória (Borish & Steinke, 2003).

As quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular que estão envolvidas na quimiotaxia de leucócitos, regulando a sua migração até ao local da infeção e a sua posterior ativação (Borish & Steinke, 2003; Murphy, 2013; Tizard, 2013). As quimiocinas com grupo C-X-C 10 (CXCL10) e 8 (CXCL8 ou interleucina-8, IL-8) são exemplos de quimiocinas importantes no desenvolvimento da resposta inflamatória (Kayser *et al.*, 2005).

No endométrio de úteros de cadelas com piómetra foi detetado um aumento da transcrição dos genes que codificam para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β e a quimiocina IL-8 (Carvalho, 2014). Também foram detetadas citocinas pró e anti-inflamatórias no soro de cadelas com piómetra, as quais podem desempenhar papéis relevantes no desenvolvimento da doença sistémica (Karlsson *et al.*, 2012). Na tabela 1 estão referenciadas as principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória, as respetivas funções e principais células produtoras.

Tabela 1 - Principais citocinas produzidas na resposta inflamatória aguda, células produtoras e respectivas funções.

Citocina	Principais células produtoras	Principais funções	Referências
IL-1	Monócitos/macrófagos, linfócitos B e T, neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais.	<ul style="list-style-type: none"> - Indução de febre, responsável por sinais sistêmicos; - Síntese de proteínas de fase aguda; - Estimulação da adesão de leucócitos ao endotélio; - Ativação de linfócitos T, estimulação da proliferação de linfócitos B; - Indução da produção de citocinas e quimiocinas; - Diferenciação de células Th17. 	Borish & Steinke, 2003; Dinarello, 2009; Feghali & Wright, 1997; Gérard, Caillaud, Martoriati, Goudet, & Lalmanach, 2004.
IL-6	Linfócitos B e T, monócitos, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais.	<ul style="list-style-type: none"> - Diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e estimulação da produção de imunoglobulinas; - Síntese de proteínas de fase aguda; - Diferenciação de células Th17, em conjunto com TGF-β; - Regulação da expressão de quimiocinas. 	Leonard, 2003; Mihara, Hashizume, Yoshida, Suzuki, & Shiina, 2012; Rincon, 2012; Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, & Rose-John, 2011.
IL-8 (CXCL8)	Monócitos /macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais.	<ul style="list-style-type: none"> - Ação quimiotática para neutrófilos; - Desgranulação de neutrófilos. 	Akdis <i>et al.</i> , 2011; Harada <i>et al.</i> , 1994; Kayser <i>et al.</i> , 2005 Mukaida, 2003.

Tabela 1 - Principais citocinas produzidas na resposta inflamatória aguda, células produtoras e respectivas funções (continuação)

Citocina	Principais células produtoras	Principais funções	Referências
CXCL10	Leucócitos, neutrófilos, monócitos, células epiteliais e endoteliais, células do estroma.	- Ação quimiotática e ativação de macrófagos, células dendríticas, células <i>Natural Killer</i> (NK) e linfócitos T; - Ativação de linfócitos B; - Promoção da apoptose.	Liu <i>et al.</i> , 2011.
IL-10	Monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, células dendríticas.	- Ação anti-inflamatória; - Regulação negativa da expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimuladoras na superfície de monócitos/macrófagos e células dendríticas; - Inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas.	Abbas & Lichtman, 2003; Akdis <i>et al.</i> , 2011; O'Shea <i>et al.</i> , 2013.
TGF-β	Monócitos/macrófagos, linfócitos T, plaquetas, fibroblastos.	- Modulação da inflamação, reparação tecidual; - Inibição da proliferação e ativação de células NK e linfócitos T; - Inibição da proliferação de linfócitos B e secreção de imunoglobulinas pelos plasmócitos.	Borish & Steinke, 2003; Feghali & Wright, 1997; Taylor, 2009.
IFN tipo I IFN-α e β	Produzidos ubiquitariamente	- Ativação de células NK, macrófagos e linfócitos T citotóxicos; - Maturação de células dendríticas; - Regulação positiva de MHC classe I e negativa de MHC classe II.	O'Shea <i>et al.</i> , 2013; Stetson & Medzhitov, 2006; Takaoka & Yanai, 2006.
TNF-α	Monócitos/macrófagos, fibroblastos, mastócitos, linfócitos T, células NK.	- Indução de febre, responsável por sinais sistêmicos; - Regulação positiva da expressão de MHC classe I e II; - Ativação de células fagocitárias e indução da produção de citocinas; - Adesão de neutrófilos e monócitos/macrófagos as células endoteliais.	Abbas & Lichtman, 2003; Feghali, & Wright, 1997; O'Shea <i>et al.</i> , 2013.

OBJETIVOS

A resposta imunitária uterina está dependente da participação de diversos tipos de células, que em conjunto são responsáveis pela eliminação do agente patogénico (Turner *et al.*, 2012). Atualmente, as células epiteliais já não são consideradas apenas uma barreira física, sendo reconhecido o seu papel na resposta imunitária inata. Estas são as primeiras células a contactar com o agente patogénico, e após o seu reconhecimento, em conjunto com as células do estroma, promovem o afluxo de células de reação inflamatória ao útero através da produção de quimiocinas e citocinas (Amjadi *et al.*, 2014; Turner *et al.*, 2012).

Neste estudo procurou-se contribuir para o esclarecimento do mecanismo inicial da infeção desencadeado após a interação de estirpes de *Escherichia coli*, isoladas de úteros de cadelas com piómetra, com as células epiteliais e do estroma do endométrio. Assim, os objetivos deste trabalho consistiram em:

1. Estabelecer um protocolo de cultura primária de células epiteliais e do estroma a partir do endométrio de cadelas saudáveis;
2. Caracterizar os dois tipos de culturas celulares (crescimento, viabilidade, morfologia e pureza);
3. Avaliar a capacidade de duas estirpes de *E. coli*, com diferente genótipo de virulência, para aderir e internalizar células epiteliais e do estroma;
4. Caracterizar os mecanismos de resposta imunitária inata desencadeados pelas células epiteliais e do estroma em resposta à infeção por estirpes de *E. coli* com diferente genótipo de virulência.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Colheita e caracterização das amostras

1.1 Animais

Para este estudo foram utilizados úteros de cadelas saudáveis submetidas a OVH eletiva. As cirurgias foram realizadas na clínica da Liga Portuguesa dos Direitos dos Animais, no Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), no Canil Municipal de Sintra e no Consultório Veterinário do Instituto Zoófilo Quinta Carbone.

1.2 Colheita de amostras

Antes de cada OVH efetuou-se uma zaragatoa vaginal e a colheita de 2 a 3 ml de sangue para tubo seco. Imediatamente após a cirurgia, os úteros foram transportados em gelo até ao laboratório de Reprodução e Obstetrícia da FMV-UL, onde foi efetuado o seu processamento.

A partir da zaragatoa vaginal realizou-se uma citologia por esfregaço de aposição, que após secagem ao ar foi corada com Giemsa (Giemsa stain modified, Accustain®, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). O sangue foi centrifugado (3000 x g, 10 minutos) e o soro foi armazenado a -20°C para posterior doseamento de progesterona.

Os ovários e uma pequena secção transversal de cada corno uterino foram recolhidos para formol tamponado (Formaldeído a 4%, VWR, Leuven, Bélgica), no qual os tecidos se mantiveram durante aproximadamente 24 horas. O volume de formol utilizado foi cerca de 10 vezes superior ao volume dos tecidos colhidos. Os fragmentos foram processados pelo Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-UL, onde foram incluídos em parafina e realizados cortes para coloração com Hematoxilina & Eosina.

Seguidamente à abertura longitudinal dos cornos uterinos, realizou-se uma zaragatoa para cultura microbiológica. O processamento desta amostra foi efetuado pelo Laboratório de Microbiologia da FMV-UL e apenas foram utilizados para o estudo úteros sem contaminação bacteriana.

1.3 Determinação da fase do ciclo éstrico

A fase do ciclo éstrico foi determinada com base na análise da citologia vaginal, nas características macroscópicas e microscópicas do útero e ovários e no doseamento de progesterona sérica. O

doseamento da progesterona foi efetuado sem extração da amostra por quimioluminescência (Immulite 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Lda., Amadora, Portugal), utilizando um *kit* comercial (Immulite 1000 Progesterone Kit, Siemens). O coeficiente de variação inter-ensaio para o controlo CON5 (2,9 ng/ml) e CON6 (13,2 ng/ml) variou entre 2-4% (Multivalent Control Module, Siemens). Este procedimento foi efetuado no Laboratório de Endocrinologia da FMV-UL.

2. Isolamento e cultura primária de células epiteliais e do estroma do endométrio da cadela

Neste trabalho foi especificamente concebido e otimizado um protocolo de cultura de células para permitir a obtenção de culturas primárias de células epiteliais e do estroma, com um nível de pureza aceitável. Os processos de separação e purificação das frações de células epiteliais e do estroma foram adaptados de Bläuer, Heinonen, Matikainen, Tomás e Ylikomi (2005) e de Stadler, Handler, Schoenkypl e Walter (2009), com modificações.

A otimização do protocolo de cultura de células foi realizada em oito úteros de cadelas em diferentes fases do ciclo éstrico, até se obter um protocolo que permitisse uma separação eficaz das duas frações celulares de interesse. Após essa otimização, foram utilizados seis úteros de cadelas na primeira metade de diestro, para avaliação da cultura celular e estudos de incubação com bactéria.

Na figura 4 estão ilustradas as principais etapas envolvidas no isolamento e purificação de células do endométrio canino, tendo por base o protocolo que foi criado e otimizado.

Cada útero foi lavado em meio de lavagem constituído por *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, GIBCO®, Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA), 50 µg/ml de gentamicina (Gentamicin Solution, 50 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 2,5 µg/ml de anfotericina B (Anfotericin B Solution, 250 µg/ml, Sigma-Aldrich). De seguida, com recurso a material cirúrgico estéril, o endométrio foi exposto através de corte longitudinal dos cornos uterinos. Cortaram-se pequenos pedaços (2 a 4 mm) de endométrio para uma placa de Petri com novo meio de lavagem. Os fragmentos de tecido foram lavados mais duas a três vezes com meio de lavagem para remover a maioria dos eritrócitos.

Após este passo, os pedaços de endométrio foram digeridos em 15 a 20 ml de meio de digestão constituído por meio *Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640, GIBCO®), 1 mg/ml de collagenase tipo A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), 5 µg/ml de DNase I

(Sigma-Aldrich), 50 µg/ml de gentamicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B, durante 60 a 90 minutos a 37°C, sob agitação suave.

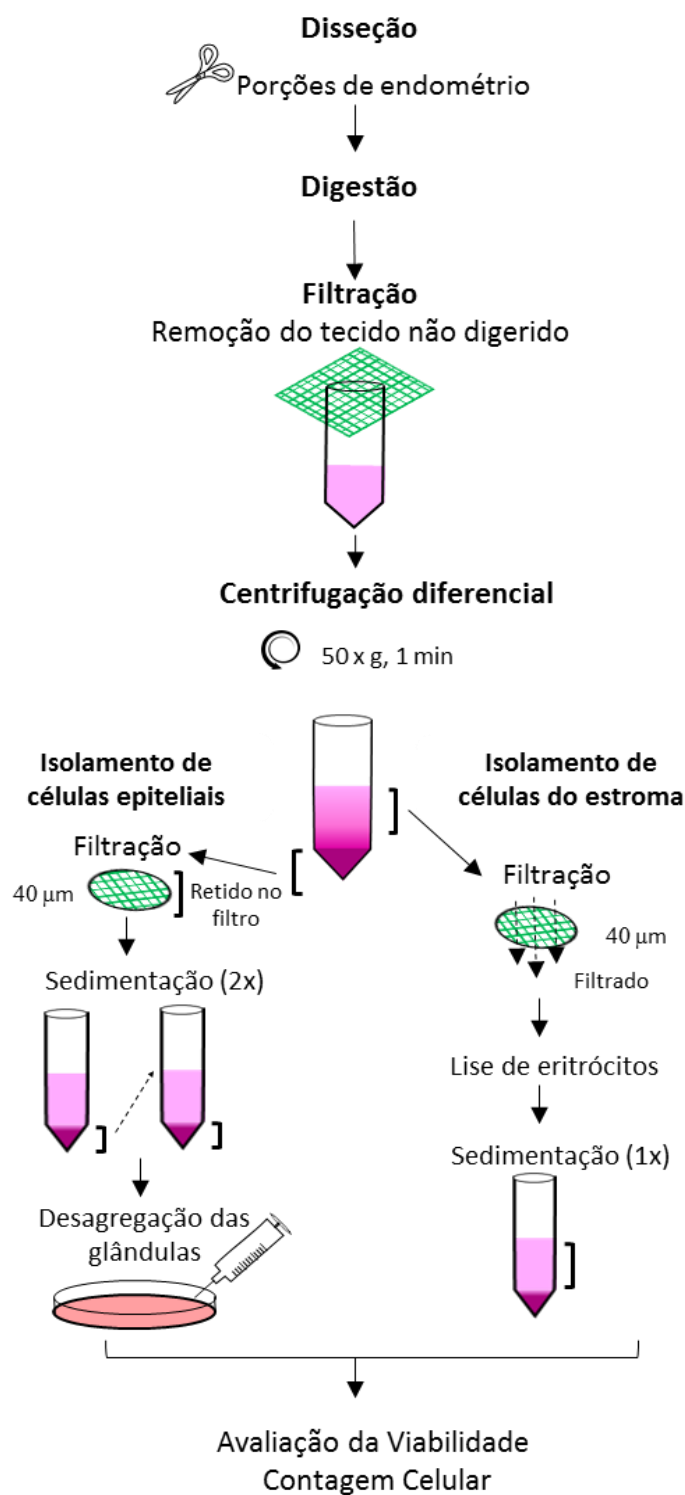


Figura 4 - Principais etapas do protocolo de isolamento e purificação de células endometriais

Seguidamente à digestão, o meio foi filtrado através de uma rede estéril, de forma a remover pedaços de tecido não digeridos. Adicionaram-se 20 ml de meio de cultura constituído por RPMI-1640, 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, GIBCO®), 50 µg/ml de gentamicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B. Após uma centrifugação (200 x g, 5 minutos) o sedimento foi ressuspendido em 10 ml do mesmo meio. Seguiu-se um passo de centrifugação diferencial de 50 x g durante 1 minuto para separar a fração glandular (fração inferior) da fração de células do estroma (fração superior). Ambas as frações foram colhidas e processadas em separado, de forma a serem purificadas.

2.1 Isolamento e purificação de células do estroma

O sobrenadante rico em células do estroma foi sujeito a uma filtração através de um filtro de poro 40 µm (BD Falcon™, Erembodeger, Belgium) para eliminar qualquer contaminação da fração com glândulas uterinas. As estruturas glandulares ficam aprisionadas na rede do filtro e as células do estroma e alguns eritrócitos passam através do filtro. O filtrado foi centrifugado (200 x g, 5 minutos) para recuperar as células do estroma e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1 ml de água destilada estéril ao sedimento, para provocar a lise dos eritrócitos. Após 30 segundos, durante os quais a suspensão foi homogeneizada por pipetagem, foram adicionados 9 ml de meio de cultura, seguindo-se uma centrifugação (200 x g, 5 minutos). Sempre que necessário, em situações de permanência de uma tonalidade vermelha no sedimento devido a grande quantidade de eritrócitos, o passo de lise de eritrócitos foi repetido. Seguidamente, o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de meio e deixado sedimentar durante 5 minutos após ser adicionado no topo de uma coluna de líquido de 10 ml de meio RPMI-1640, num tubo de 50 ml. Esta sedimentação constitui um passo adicional de purificação para eliminar estruturas glandulares, as quais sedimentam primeiro que os fibroblastos. Após este período de tempo, o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo, centrifugado (200 x g, 5 minutos) e ressuspendido em 1 ml de meio de cultura, para a posterior contagem celular.

2.2 Isolamento e purificação de células epiteliais glandulares

O sedimento proveniente da centrifugação diferencial, rico em glândulas endometriais, foi filtrado através de um filtro de poro 40 µm (BD Falcon™). As estruturas glandulares ficaram retidas no filtro, e o filtrado que incluía algumas células do estroma e eritrócitos foi descartado. Dependendo da abundância de glândulas existente no sedimento, foram utilizados dois a três filtros. As

glândulas foram recuperadas por lavagem retrógrada do filtro para uma placa de Petri. A suspensão resultante da lavagem dos filtros foi centrifugada (200 x g, 5 minutos) e o sedimento rico em glândulas foi ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura. Esta suspensão foi sujeita a dois passos de sedimentação idênticos ao realizado para a fração de células do estroma, mas nos quais o componente de interesse é o sedimento. Após a recolha das glândulas sedimentadas pela segunda vez, foi feita uma centrifugação (200 x g, 5 minutos), descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 3 ml de tripsina 0,25 % - EDTA (GIBCO ®) com 5 µg/ml de DNase I. Após 2 minutos a 37°C, em atmosfera húmida com 5% de CO₂ (Estufa Hera Cell 150, Heraeus Instruments GmbH, Alemanha), as glândulas foram desagregadas por aspirações sucessivas através de uma agulha de 26G acoplada a uma seringa de 2 ml. Este processo teve como finalidade separar as células epiteliais da estrutura glandular tridimensional, de forma a garantir uma distribuição mais homogênea das células nos poços das placas de cultura. Sempre que necessário o procedimento de desagregação foi repetido mais uma vez. Por fim, as células epiteliais foram centrifugadas (200 x g, 5 minutos) e ressuspensionadas em 1 ml de meio de cultura para contagem celular.

2.3 Avaliação da viabilidade, contagem celular e plaqueamento

A concentração de células obtida foi determinada após contagem em câmara de Neubauer, numa ampliação de 100x em microscópio de contraste de fase. A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de exclusão de azul tripano a 0,4% (Sigma-Aldrich), numa diluição de 1:2 da suspensão celular. As células que incorporaram o corante, apresentado citoplasma azul, foram consideradas não viáveis, enquanto que as que excluíram o azul tripano foram consideradas células viáveis.

As células do estroma e epiteliais foram colocadas em placas de cultura de 24 poços (Thermo Scientific, Roskilde, Denmark) numa concentração de 1×10^5 células/ml e 2×10^5 células/ml, respetivamente, num volume total de 1 ml de meio de cultura, suplementado com Insulina-Transferrina-Selénio (1x) (ITS liquid media supplement, 100x, Sigma-Aldrich), por poço. Nos poços de cultura destinados a coloração com Giemsa, antes da introdução das células foram colocadas lamelas de vidro (Normax, Marinha Grande, Portugal), previamente tratadas por sonicação. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera húmida com 5% de CO₂.

Após 12 horas de incubação, o meio da cultura de estroma foi trocado. Este passo constitui mais um método de purificação, uma vez que 12 horas são suficientes para garantir a adesão dos fibroblastos, mas não das células epiteliais que se encontram em suspensão e são removidas com a

troca de meio. Após este passo, o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas até o tapete celular atingir uma confluência de aproximadamente 90%.

2.4 Avaliação da pureza da cultura

A avaliação da pureza da cultura foi realizada com base na diferente morfologia celular das células epiteliais e do estroma, em lamelas coradas com Giemsa (Accustain®). Após a cultura atingir a confluência desejada, a lamela foi coberta com o corante Giemsa durante um período de tempo de 3 minutos, após o qual se seguiram mais três minutos de incubação com adição de igual volume de água destilada. Posteriormente, as lamelas foram lavadas em água destilada e montadas em lâminas de vidro com Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Foram capturadas 5 fotografias em campos aleatórios da lamela, numa ampliação de 100x num microscópio (Olympus, BX51) equipado com câmara fotográfica (Olympus, DP21). Em cada campo foi contada a totalidade das células, e classificada de acordo com a sua morfologia, contando um mínimo de 400 células em cinco campos.

3. Incubação das culturas de células epiteliais e do estroma com *Escherichia coli*

3.1 Estirpes de *Escherichia coli*

Neste estudo foram utilizados dois isolados de *Escherichia coli*, Pyo14.1 e Pyo18, obtidos de úteros de cadelas com piômetra. Estes isolados foram anteriormente caracterizados quanto ao seu potencial de virulência através do rastreio por PCR convencional de genes que codificam para fatores de virulência (Henriques *et al.*, 2014). Entre outros, neste rastreio foram incluídos genes que codificam para fatores potencialmente envolvidos na adesão (*fimH*, *fimA*: genes que codificam componentes das fímbrias do tipo 1; *papEF* e *papC*: genes que codificam componentes das fímbrias P; *sfa/focDE*: codificam um componente comum às fímbrias S e F1C; *focG*: codifica um componente das fímbrias F1C), na produção de toxinas (*hlyA* e *cnfI*) e de fatores que interferem com a resposta do hospedeiro à infeção (*tcpC*). Tendo em conta estes genes potencialmente associados à virulência, o isolado Pyo14.1 apresenta o genótipo *fimH*⁺ *fimA*⁺, *papEF*⁻, *papC*⁻, *sfa/focDE*⁺, *fogG*⁺, *hlyA*⁻, *cnfI*⁻, *tcpC*⁻ e o isolado Pyo18 o genótipo *fimH*⁺, *fimA*⁺, *papEF*⁺, *papC*⁺, *sfa/focDE*⁺, *fogG*⁻, *hlyA*⁺, *cnfI*⁺ e *tcpC*⁺. De acordo com a sua caracterização genética, estes dois isolados correspondem a duas estirpes de *E. coli* geneticamente diferentes, pertencentes

ao grupo filogenético B2, de maior potencial de virulência (Henriques *et al.*, 2014). Foi verificado que estas duas estirpes apresentam taxas de crescimento semelhantes em meio líquido Lúria Bertani (LB).

3.2 Preparação da cultura bacteriana para os ensaios de incubação com bactéria

A partir das estirpes preservadas a -80°C foi feita propagação em placas de Agar Columbia com 5% de sangue de carneiro (COS, Biomérieux, Marcy l'Étoile, França) as quais foram incubadas a 37°C durante 16 horas. Foi sempre confirmado o fenótipo não hemolítico da estirpe Pyo14.1 e o fenótipo hemolítico de Pyo18, após o crescimento nas placas de COS. Posteriormente foi repicada uma colônia para meio líquido LB (Nzytech, Lisboa, Portugal) e incubada a 37°C durante 48 horas, sem agitação (condição estática de crescimento). As bactérias foram recolhidas por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram ressuspendidas em 20 ml de tampão fosfato salino (PBS). Repetiu-se este passo de centrifugação e lavagem mais duas vezes. Seguidamente, a densidade ótica (DO) da suspensão, medida a 600 nm, foi ajustada para 0,3, o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/ml.

Em cada poço foi inoculado um volume correspondente a um determinado número de bactérias, definido pela multiplicidade de infecção (MOI) pretendida. A MOI corresponde à razão entre o número de bactérias e o número de células. A título de exemplo, uma MOI de 10 corresponde a uma inoculação de 10 bactérias por cada célula presente no poço.

3.3 Preparação das células endometriais para os ensaios de incubação com bactéria

O meio de cultura das células endometriais foi trocado para meio sem antibiótico (RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS) cerca de 2 horas antes da inoculação, após a realização de duas lavagens do tapete celular com 500 µl de PBS.

A tripsinização e contagem celular foram realizadas em duplicado para cada tipo celular. Para esse efeito, adicionou-se 100 µl de tripsina 0,25%-EDTA a cada poço. Após 5 minutos de incubação a 37°C, a atividade enzimática da tripsina foi inativada com a adição de 900 µl de RPMI-1640 com 10% de FBS. A suspensão celular foi recolhida e, após homogeneização suave, o número médio de células foi contado em câmara de Neubauer.

3.4 Ensaio de adesão

A determinação da adesão bacteriana às células endometriais foi realizada de acordo com o método descrito por Letourneau, Levesque, Berthiaume, Jacques e Mourez (2011), com modificações. A bactéria na MOI pretendida (inferior a 10, entre 10 e 20, ou entre 20 e 30) foi adicionada ao meio de cada poço da placa de cultura. Após 1 ou 4 horas de incubação, o meio de cultura dos poços foi recolhido e as células foram submetidas a três lavagens com 1 ml de PBS, de forma a remover as bactérias não aderentes. Em cada poço foi adicionado 1 ml de PBS com 0,1% de Triton X-100, o qual foi incubado durante 5 minutos para lisar as células. Para garantir que as bactérias aderentes são libertadas do tapete celular, a solução foi pipetada várias vezes contra o fundo do poço antes de ser recolhida. Esta suspensão foi centrifugada e o sedimento foi ressuspensionado em 1 ml de cloreto de sódio a 0,9%, a partir do qual se fizeram diluições de base 10. Este último procedimento foi também efetuado para o meio de cultura recolhido antes das lavagens com PBS. As diluições mais apropriadas para cada situação foram semeadas por espalhamento de 100 µl em placas LB agar, as quais foram incubadas a 37°C durante 16h. Cada ensaio foi realizado em duplicado, tendo sido efetuados 2 a 4 ensaios por cada MOI testada. Os resultados foram apresentados na forma de UFC/ml calculados com base na quantidade de bactéria aderente às células e em percentagem de adesão. A percentagem de adesão foi calculada em função da quantidade de bactéria aderente às células e da quantidade de bactéria não aderente (presente no meio de cultura) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ adesão} = \frac{\text{UFC/ml aderentes}}{\text{UFC/ml não aderentes} + \text{UFC/ml aderentes}}$$

3.5 Ensaio de Internalização

Após 1 ou 4 horas de incubação com a bactéria, nas mesmas MOIs utilizadas no ensaio de adesão, o meio de cultura foi removido. As células foram submetidas a 3 lavagens com 1 ml de PBS e o meio foi substituído por meio de cultura composto por RPMI 1640, com 10% de FBS e suplementado com 50 µg/ml de gentamicina para matar as bactérias que não internalizaram. Após 1 hora e 30 minutos, o meio de cultura foi removido e foram realizadas 3 lavagens adicionais com 1 ml de PBS, antes de as células serem lisadas e recolhidas pelo método anteriormente descrito no ensaio de adesão. As diluições e sementeiras para contagem da bactéria foram realizados de acordo com o procedimento descrito no ensaio de adesão. Para garantir que a gentamicina foi eficaz

enquanto bactericida, o meio de cultura de alguns poços foi recolhido e semeado por espalhamento em placas de LB agar. Cada ensaio foi realizado em duplicado. Os resultados são apresentados na forma de UFC/ml de bactéria internalizada e de percentagem de internalização. A percentagem de internalização foi calculada em função da quantidade de bactéria internalizada e da quantidade de bactéria aderente às células, calculada a partir do ensaio de adesão.

$$\% \text{ internalização} = \frac{\text{UFC/ml internalizadas}}{\text{UFC/ml aderentes}}$$

Ao longo da dissertação, este ensaio será referido como ensaio de internalização de 1 ou 4 horas, período este que corresponde ao tempo de estimulação, mas ao qual são acrescidos mais 90 minutos de incubação com meio de cultura suplementado com gentamicina.

3.6 Colheita de amostras para extração de ARN

Com o objetivo de extrair ARN das células, no final do ensaio de internalização, em poços destinados a esse efeito e após a última lavagem com PBS, as células de dois poços idênticos foram recolhidas num volume final de 350 µl de tampão RLT (tampão do *kit* comercial de extração de ARN; *Rneasy mini kit*, Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). Esta análise foi efetuada em dois ensaios independentes (dois úteros), a partir de culturas celulares (epitelial e do estroma) estimuladas com uma MOI que variou entre 10 e 15. Como controlo positivo da estimulação, inocularam-se poços de cultura celular com 1µg/ml de LPS purificado (*E. coli* O55:B5, Sigma-Aldrich), aos quais foi aplicado o mesmo procedimento de recolha de células para extração de ARN. As amostras em tampão RLT foram armazenadas a -80°C até posterior utilização.

3.7 Contagem de células após estimulação com bactéria

Para avaliar indiretamente o efeito citotóxico das bactérias foi estimado o número de células aderentes ao poço da placa de cultura, após incubação com as duas estirpes bacterianas (Pyo14.1 e Pyo18). Foi efetuado o mesmo procedimento anteriormente descrito para o ensaio de internalização e após a última lavagem com PBS, as células foram tripsinizadas tal como descrito em 3.3. Os dados foram apresentados como percentagem em relação ao controlo negativo, o qual não foi incubado com bactéria. A contagem do número de células foi realizada em duplicado em 2 a 3 ensaios independentes.

3.8 Coloração Giemsa

A avaliação da especificidade dos resultados de adesão e internalização foi confirmada por coloração Giemsa de lamelas submetidas aos ensaios de internalização e de adesão com as duas estirpes. Esta coloração foi efetuada tal como descrito em 2.4.

4. Quantificação relativa da transcrição de componentes das vias dos TLRs por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

4.1 Extração de ARN e síntese de ADN complementar (ADNc)

Após descongelamento dos sedimentos celulares armazenados a -80°C em tampão RLT, foi efetuada a extração de ARN total, com o *kit* comercial *Rneasy mini kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Para digerir o ADN genómico recorreu-se à utilização do *kit RNase-free DNase Set* (Qiagen GmbH). Após a extração, a concentração e pureza do ARN foram determinadas através da leitura da absorvância a 260 e 280 nm no equipamento *Nanodrop 2000C Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). A pureza das amostras foi avaliada pela relação entre os valores das leituras a 260nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) sendo que valores abaixo de 1,8 indicam contaminação com proteína e acima de 2 contaminação com os tampões de extração usados no procedimento experimental. As amostras de ARN foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até posterior utilização.

A síntese de ADNc foi efetuada com o *kit* comercial *Superscript[®] III First Strand Synthesis Supermix for qRT-PCR* (Invitrogen Corporation, Nova Iorque, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando 400 ng de ARN total. O ADNc foi diluído (1:10) em água e as amostras foram armazenadas a -20°C .

4.2 Oligonucleótidos iniciadores

Os oligonucleótidos iniciadores foram escolhidos inicialmente através do programa Primer3 Software, sendo posteriormente confirmados com o programa Primer Express[®] Software (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Sempre que possível, os oligonucleótidos iniciadores foram desenhados em dois exões diferentes (adjacentes), de forma a evitar a amplificação de ADN genómico. Na tabela 2 estão indicadas as sequências nucleotídicas dos oligonucleótidos iniciadores escolhidos e o respetivo tamanho do produto de PCR.

Tabela 2 – Oligonucleótidos iniciadores utilizados para PCR em tempo real

Gene	Sequência 5'-3'	Produto de PCR (pb)	Nº Acesso (Genebank)
TLR4	FW-CTCTTGTCATTGGATACACTAGCTT RV-TGCTGTTGTCCTTGTTCTTGA	105	NM_001002950
TLR2	FW-CACCTTCAATCCCCGTTCAA RV-AATAATCCACTTGCCGGAATA	66	NM_001005264
CD14	FW-TTAGGTGCAACAAGCTGAACAGAG RV-GTCGTCGGGTTTTCTTGGTACTT	124	XM_843653
NF-KB1	FW-GGAGGAGACCGGCAGCTTA RV-GCCGGTGCTATCTGGAAGAA	129	NM_001003344.1
IRF3	FW -TCACCACGCTACACCCTCTG RV -ATTTCCAGCAGGGCCCTAAG	119	XM_005616307.1
IRF7	FW- GTCGGGGCTCCCCATACTAC RV- CCCTTCTCGCTGCACGTACT	143	XM_005631711.1
TNF-α	FW- CTGCCTCAGCCTCTTCTCCTT RV- CTGGGCAAGAGGGCTGATTA	133	NM_001003244.4
IL-1β	FW-GAAGAAGCCCTGCCCCACA RV-AATTATCCGCATCTGTTTTGCAG	104	NM_001037971
IL-6	FW-CTGGCAGGAGATTCCAAGGAT RV-TCTGCCAGTGCCTCTTTGC	167	NM_001003301
IL-8	FW-TTGCTCTCTTGGCAGCTTTTG RV-TTTGGGATGGAAAGGTGTGG	122	NM_001003200
IL-10	FW-ACATCAAGAACCACGTGAACTCC RV-ACTCACTCATGGCTTTGTAGACACC	177	NM_001003077
TGF-β1	FW-AGCCCGAGGCGGACTACTAC RV-CGGAGCTCTGATGTGTTGAAGA	130	NM_001003309
IFN-β	FW – GAAGCTCCACTGGCAGAAGG RW- TGGCCTTCAGGTACTGCACA	137	NM_001135787.1
CXCL10	FW- TCCTGCAAGTCCATCGTGTC RV-ATTGCTTTCACTAAACTCTTGATGGTC	114	NM_001010949.1
RPL27	FW-TCGTCAACAAGGATGTCTTCAGAG RV-TCTTGCCAGTCTTGTACCTCTCCT	96	NM_001003102

4.3 qRT-PCR

O PCR em tempo real foi executado com 2 ng de ADNc, 80 nM de cada oligonucleótido iniciador e 1x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e água RNase free (Water RNase-free DEPC treated, USB corporation, Cleveland, USA) para perfazer um volume final de reação de 12,5 µl. As reações foram feitas em duplicado, em placas de 96 poços (Applied Biosystems, Warrington, UK). O gene *rlp27* foi utilizado como controlo endógeno. A reação de amplificação foi realizada no equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems), usando o ciclo universal de amplificação sugerido pelo fabricante, com aquisição de curvas de dissociação. A especificidade da amplificação foi confirmada por análise das curvas de dissociação, confirmando a amplificação de um produto único, e por eletroforese do produto de PCR em gel de agarose a 2,5% com brometo de etídio, para confirmar o seu peso molecular.

A quantificação do ARNm por PCR em tempo real foi feita com base no C_t (*Threshold Cycle*: número de ciclos necessários para o início da amplificação). Quanto menor o valor do C_t obtido para o gene alvo da amostra, maior a amplificação, e consequentemente, maior a expressão do transcrito.

A análise da expressão relativa de ARNm foi realizada com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ desenvolvido por Livak e Schmittgen (2001). Este tipo de quantificação (relativa) baseia-se na comparação da expressão de um ARNm numa amostra alvo (neste caso, amostras estimuladas) e numa amostra calibradora (controlo negativo). De forma resumida, este método de quantificação utiliza a seguinte fórmula:

$$N\text{-fold} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Desta forma, para cada gene em estudo, a variação da expressão do ARNm na amostra alvo em relação à amostra calibradora foi expressa em *N-fold* (múltiplo de vezes em relação à expressão no controlo negativo, não estimulado), e apenas as variações de *fold* > a 2 ou < a 0,5 foram consideradas como relevantes. A título de exemplo, uma amostra alvo com a variação na transcrição de determinado gene de 1 *fold* significa que transcreve exatamente o mesmo que a amostra calibradora, com 3 *fold* o triplo da transcrição do calibrador e com 0,2 *fold* apenas 20% da transcrição do calibrador.

5. Análise estatística

Tendo em conta que este trabalho é baseado em ensaios preliminares, o número de experiências independentes realizadas não foi suficiente para permitir a realização de análise estatística, motivo pelo qual não será apresentada.

RESULTADOS

1. Caracterização da cultura celular: viabilidade, morfologia, crescimento e pureza

A combinação de processos de filtração, centrifugação diferencial, sedimentação e a adesão seletiva dos fibroblastos revelou-se eficaz no isolamento e estabelecimento de culturas de células epiteliais e do estroma.

A viabilidade das células epiteliais e do estroma, verificada pela exclusão de azul tripano foi cerca de 80% e 90%, respetivamente. Após o plaqueamento, as células do estroma começaram rapidamente a aderir à placa de cultura e completaram a sua adesão nas primeiras 12 horas de cultura. A adesão das células epiteliais foi mais lenta, ocorrendo progressivamente nas primeiras 12 a 36 horas. As culturas de células do estroma apresentaram um aspeto homogêneo, com células que, após as primeiras 24 horas, exibiam uma morfologia fusiforme, característica dos fibroblastos. O crescimento rápido destas culturas permitiu que após dois a três dias se estabelecesse um tapete com a confluência desejada (cerca de 90%). As culturas de células epiteliais foram caracterizadas por células de morfologia arredondada ou poligonal, de tamanho superior ao das células do estroma. Inicialmente cresceram em núcleos que se expandiam até convergirem. O crescimento desta cultura foi sistematicamente mais lento que o da cultura de células do estroma, demorando três a quatro dias até a atingir a confluência pretendida (cerca de 90%).

A análise da pureza da cultura foi realizada por microscopia ótica em lamelas coradas com Giemsa, com base nas características morfológicas de cada tipo celular acima descritas (Figura 5). Caso a

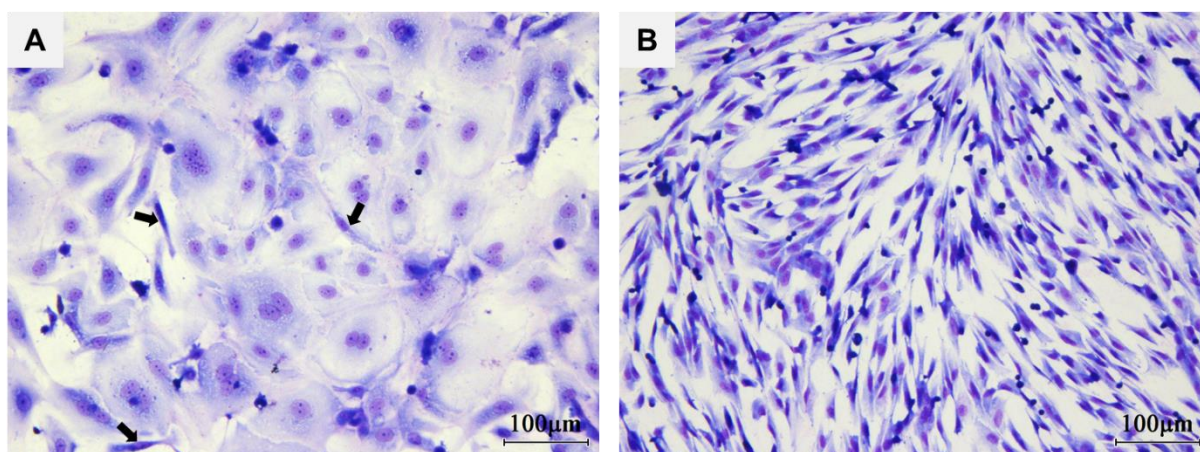


Figura 5- Aspeto morfológico (coloração de Giemsa) da cultura de células epiteliais (A) e da cultura de células do estroma (B). As setas na imagem A mostram exemplos de células do estroma presentes na cultura de células epiteliais

cultura de células epiteliais se prolongasse demasiado no tempo, a pureza da mesma sofria uma diminuição. Isto deveu-se ao facto das células do estroma, não eliminadas durante o processo de separação, multiplicarem-se mais rapidamente que as células epiteliais, o que permitia que a sua proporção aumentasse. Antes do ensaio com as bactérias, as culturas de células epiteliais apresentaram uma pureza de cerca de 80%, que se revelou inferior à das culturas de células do estroma com uma pureza acima de 95%.

2. Incubação das culturas celulares com *Escherichia coli*

2.1 Análise da morfologia e integridade do tapete celular após incubação com *E. coli*

As culturas celulares de estroma e epitélio foram incubadas, durante 1 e 4 horas, com as estirpes de *E. coli*, Pyo14.1 e Pyo18, com diferente genótipo de virulência. Estas co-culturas foram estabelecidas com o intuito de avaliar a adesão e internalização bacteriana às células endometriais e a transcrição relativa de componentes das vias dos TLRs após a estimulação. No fim de cada período de incubação, foi observado o aspeto da cultura celular em microscópio ótico invertido.

2.1.1 Cultura de células do estroma

Após 1 e 4 horas de incubação com a estirpe Pyo14.1 (Figura 6 – B e E; H e K) as células do estroma não apresentavam modificações na sua morfologia e o tapete celular não sofreu alterações na integridade, quando comparado com o controlo negativo (Figura 6 - A e D; G e J). Pelo contrário, após apenas 1 hora de incubação com a estirpe Pyo18 as células do estroma já apresentavam alterações morfológicas (Figura 6 - C e F). Estas consistiram em perda da morfologia fusiforme, apresentando-se arredondadas, e as células que pareciam estar a destacar-se do tapete celular apresentavam um aspeto refringente. Após 4 horas de incubação com a estirpe Pyo18, as células do estroma aderentes à placa de cultura apresentaram-se redondas, com o centro negro e sem refringência (Figura 6, - I e L).

De forma a avaliar quantitativamente o efeito de ambas as estirpes no destacamento de células do tapete celular, após os ensaios de internalização as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. As contagens celulares revelaram que, no final do ensaio de 1 hora, os tapetes de células do estroma incubados com a estirpe Pyo14.1 mantiveram 99,6% das células em relação

ao controlo negativo. No entanto, no fim do mesmo período de tempo, as células incubadas com Pyo18 já apresentavam uma redução no seu número de 25,1%, quando comparadas com o controlo negativo.

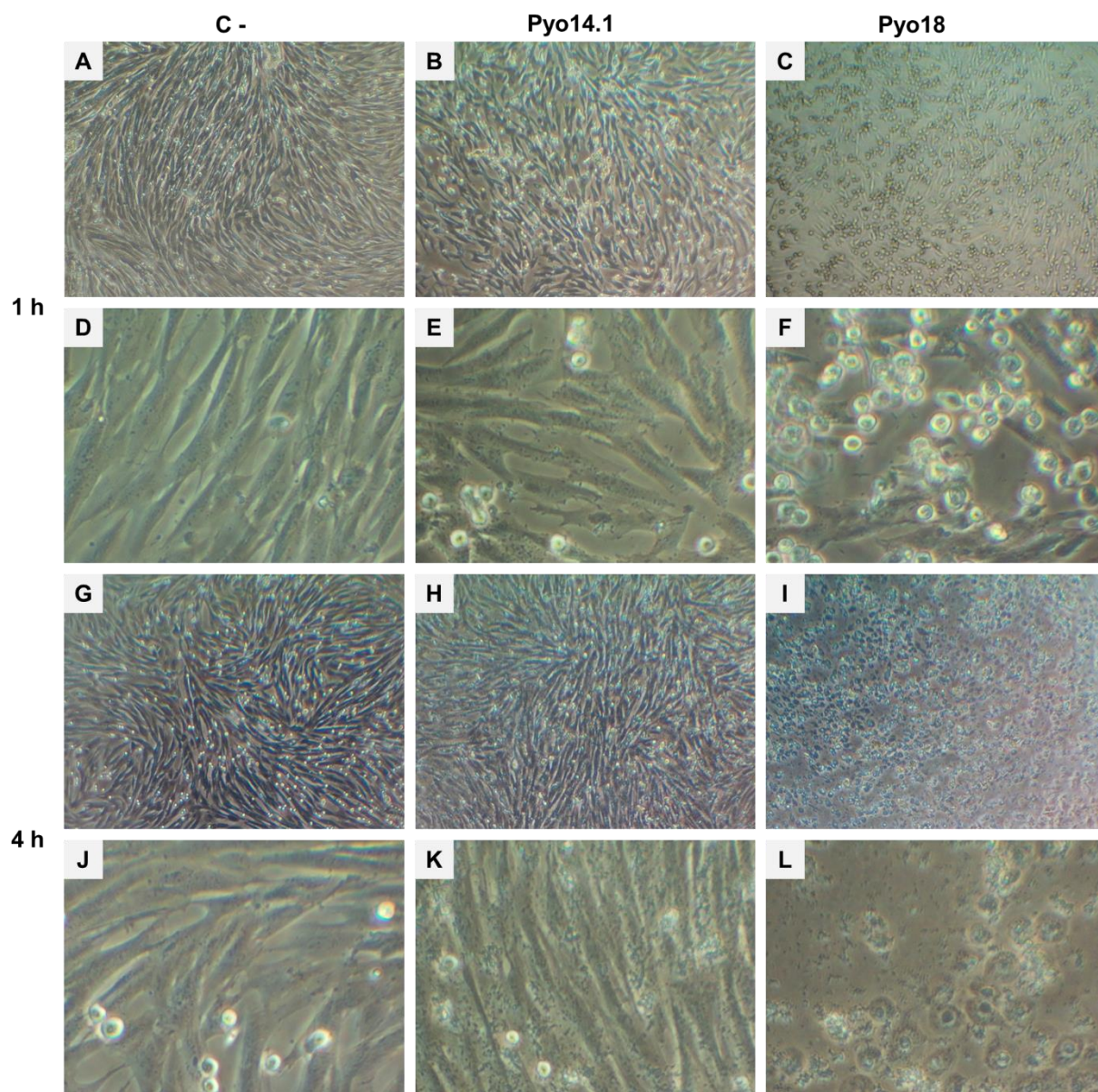


Figura 6 - Cultura de células do estroma após 1 e 4 horas de incubação com *E. coli*, visualizadas em microscópio invertido

Legenda: **A, D** – Controlo negativo após 1 hora de incubação. **B, E** – Células incubadas 1 hora com a estirpe Pyo14.1. **C, F** – Células incubadas 1 hora com a estirpe Pyo18. **G, J** – Controlo negativo após 4 horas de incubação. **H, K** – Células incubadas 4 horas com a estirpe Pyo14.1. **I, L** – Células incubadas 4 horas com a estirpe Pyo18. Fotografias tiradas em ampliação de 40x (A, B, C, G, H, I) e de 200x (D, E, F, J, K, L).

Após o ensaio de internalização de 4 horas, as culturas de células do estroma em co-cultura com Pyo14.1 conservaram 94,8% do total de células presente no controlo negativo, enquanto que o número de células contadas no fim do mesmo período de incubação com Pyo18 foi nulo.

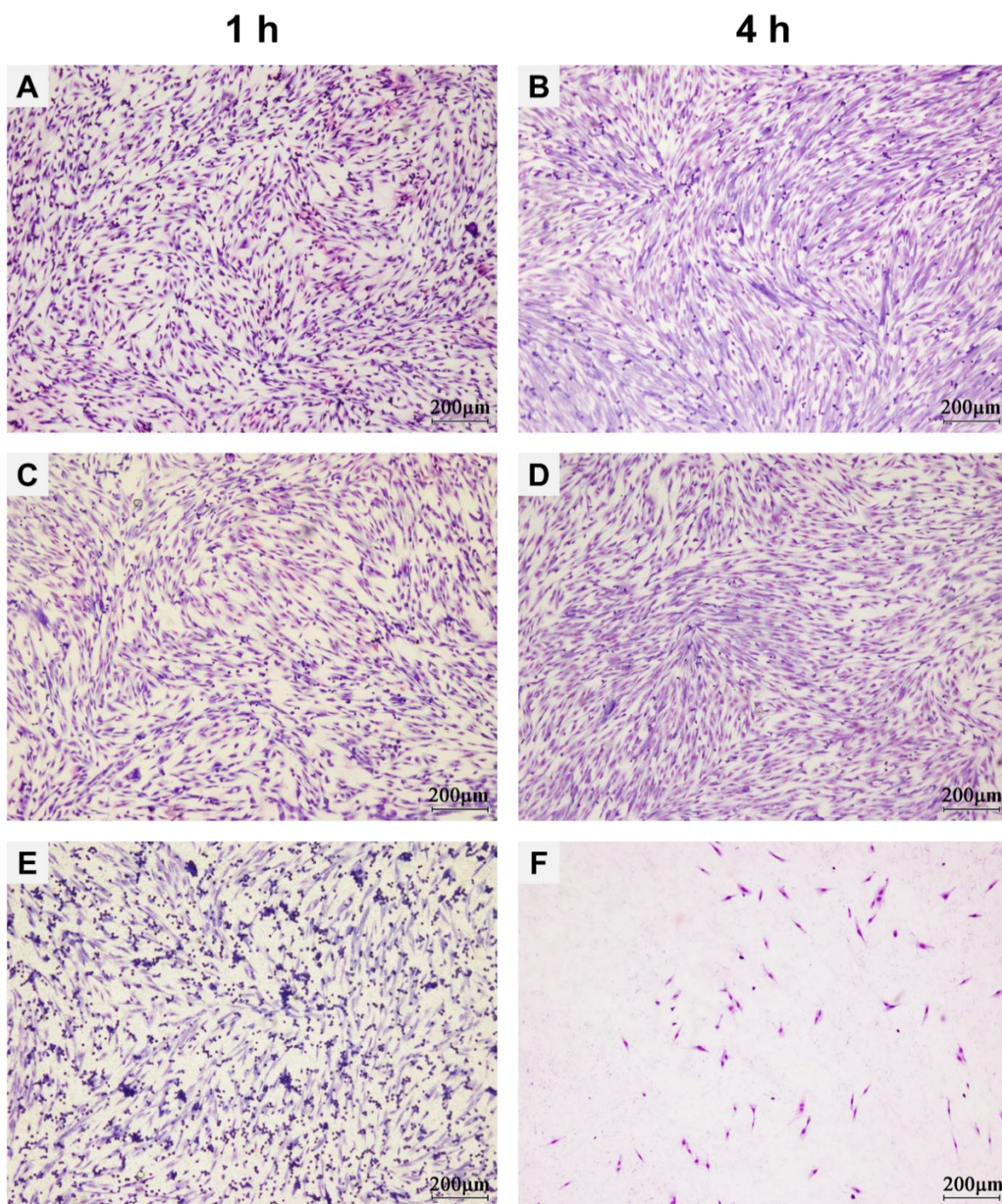


Figura 7 – Cultura de células do estroma após o ensaio de internalização

Legenda: A, B – Controlo negativo (incubado sem bactéria) após 1 e 4 horas de ensaio de internalização, respetivamente. C, D – Células incubadas com a estirpe Pyo14.1, após 1 e 4 horas de ensaio de internalização, respetivamente. E, F – Células incubadas com a estirpe Pyo18, após 1 e 4 horas de ensaio de internalização, respetivamente.

Nas lamelas coradas com Giemsa é possível observar que após 1 hora em cultura com Pyo18 o tapete mostrou-se menos preenchido e notam-se várias células de morfologia arredondada (Figura 7-E). Ao fim de 4 horas de incubação com Pyo18, foram raras as células do estroma presentes em cada campo (Figura 7-F). Por outro lado, os tapetes celulares incubados com Pyo14.1 não mostraram alterações (Figura 7-C e D), o que corrobora os resultados obtidos nas contagens de células.

2.1.2 Cultura de células epiteliais

No que diz respeito às células epiteliais, não foram detetadas alterações na sua morfologia após incubação com ambas as estirpes.

Relativamente às contagens de células epiteliais, após o ensaio de internalização de 1 hora a percentagem média de células relativamente ao controlo negativo foi de 79,9% nos poços de cultura incubados com Pyo14.1 e de 60,7% nos poços incubados com Pyo18. Esta percentagem média não sofreu alteração no ensaio de internalização das 4 horas.

Na coloração com Giemsa (Figura 8) foi possível observar que a integridade do tapete celular foi semelhante após 1 e 4 horas de incubação com cada uma das estirpes. É de salientar que na cultura de células epiteliais a estirpe Pyo18 não exibiu a capacidade de destacar o tapete celular, como ocorreu nas culturas de células do estroma após o ensaio de internalização de 4 horas.

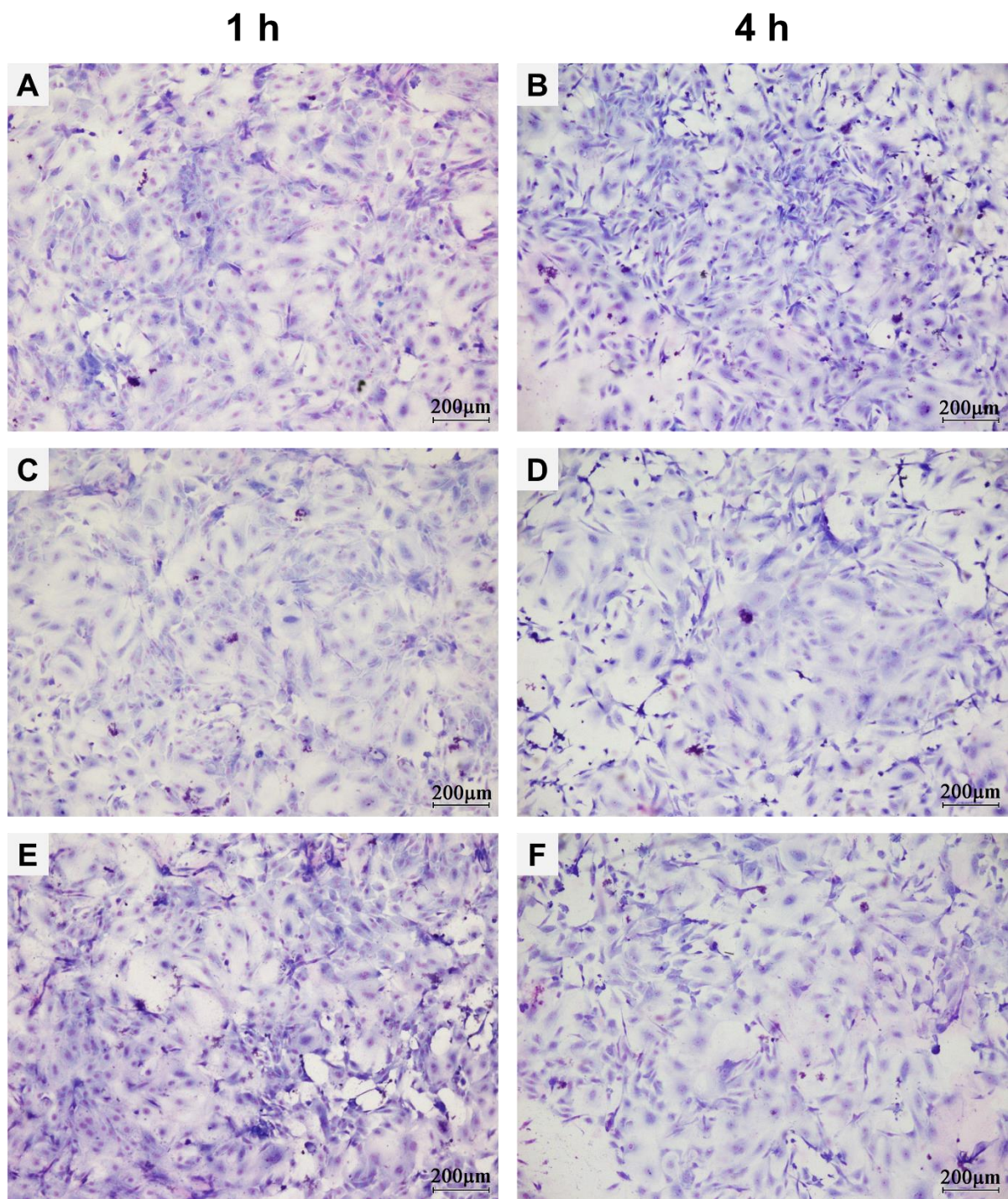


Figura 8 – Cultura de células epiteliais após o ensaio de internalização

Legenda: A, B – Controlo negativo (incubado sem bactéria) após 1 e 4 horas de ensaio de internalização, respetivamente. C, D – Células incubadas com a estirpe Pyo14.1, após 1 e 4 horas de ensaio de internalização, respetivamente. E, F – Células incubadas com a estirpe Pyo18, após 1 e 4 horas de ensaio de internalização, respetivamente.

2.2 Adesão e internalização de *E. coli*

Os ensaios de adesão e internalização foram efetuados com diferentes multiplicidades de infecção: inferior a 10, entre 10 e 20, e entre 20 e 30. Tal como referido anteriormente, em ambos os ensaios, foram testados dois tempos de incubação (1 e 4 horas) das células epiteliais e do estroma com as estirpes Pyo14.1 e Pyo18.

2.2.1 Adesão

Os resultados de adesão bacteriana (Figuras 9 e 10) são apresentados com base no número de bactérias (UFC/ml) aderentes às células e na percentagem de adesão, a qual tem em conta as bactérias não aderentes, que são contabilizadas no meio de cultura (Letorneau *et al.*, 2011).

As estirpes Pyo14.1 e Pyo18 aderiram às células epiteliais e às células do estroma em cultura *in vitro* (Figura 9 e 10, respetivamente) de forma semelhante. A magnitude da adesão nem sempre foi proporcional à MOI utilizada, não permitindo deste modo concluir se a adesão foi um fenómeno dose-dependente.

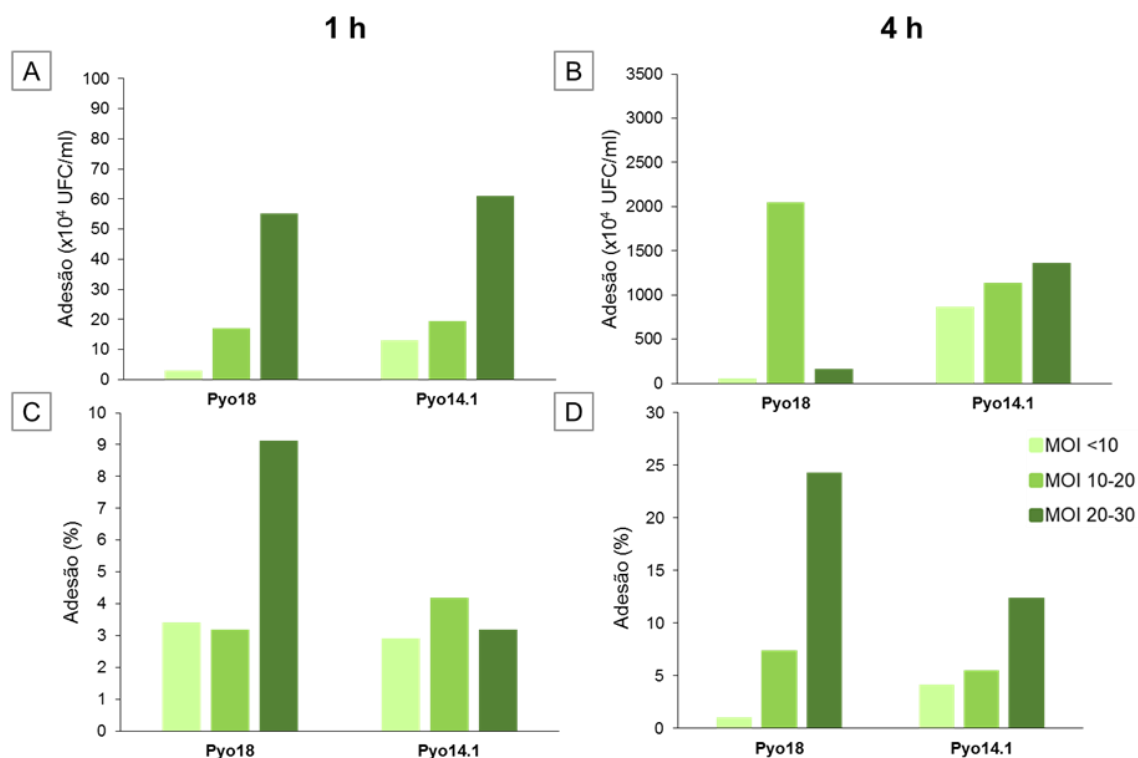


Figura 9 – Adesão das estirpes Pyo14.1 e Pyo18 às células epiteliais

Legenda: A, B – Bactéria aderente às células (UFC/ml) após 1 e 4 horas de incubação, respetivamente;
C, D – Percentagem de adesão após 1 e 4 horas de incubação, respetivamente.

Ao avaliar a adesão nas células epiteliais e do estroma percebeu-se ainda que não existiram diferenças marcantes na percentagem de adesão entre os dois tipos celulares.

A análise apenas da concentração de bactérias que aderiram pode conduzir a conclusões pouco corretas, pelo que ambos os tipos de dados devem ser avaliados em conjunto. Às 4 horas o número de bactérias (UFC/ml) que aderiram foi bastante superior ao obtido à 1 hora, no entanto a percentagem de adesão não aumentou na mesma ordem de grandeza. Contudo, observou-se um ligeiro aumento da percentagem de adesão entre a 1 e as 4 horas em ambos os tipos celulares (Figura 9-C e D; Figura 10-C e D).

A discrepância nos resultados obtidos com os dois métodos de análise provém do crescimento bacteriano no meio de cultura. O cálculo da adesão com base nas UFC/ml não contabiliza o crescimento bacteriano que ocorre durante o período de incubação, o que conduz a um aumento do número de bactérias disponíveis para aderir.

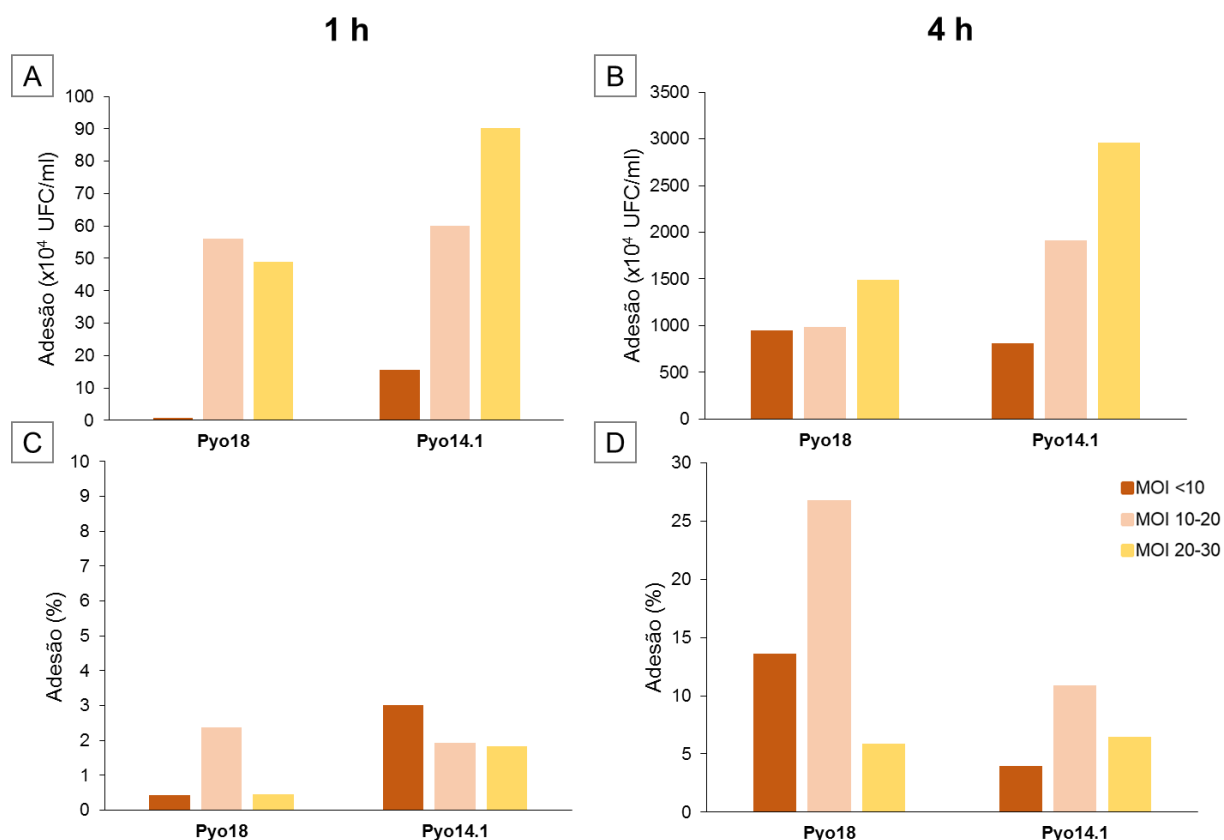


Figura 10 – Adesão das estirpes Pyo14.1 e Pyo18 às células do estroma

Legenda: A, B – Bactéria aderente às células (UFC/ml) após 1 e 4 horas de incubação, respetivamente; C, D – Percentagem de adesão após 1 e 4 horas de incubação, respetivamente.

Na cultura de células do estroma, às 4 horas parece ter havido um aumento na percentagem de adesão de Pyo18 (Figura 10-D), no entanto os resultados apresentados anteriormente revelam que o tapete celular apresentava um elevado nível de destruição nesta condição experimental. As lamelas coradas com Giemsa para avaliar a especificidade da adesão demonstraram que grande parte desta adesão foi inespecífica. As bactérias da estirpe Pyo18 aderiram ao plástico da placa de cultura que ficou mais exposto devido à destruição do tapete celular (Figura 11-B). Esta análise demonstrou ainda que à 1 hora a especificidade da adesão foi superior, existindo menos bactérias aderentes ao plástico no espaço entre as células.

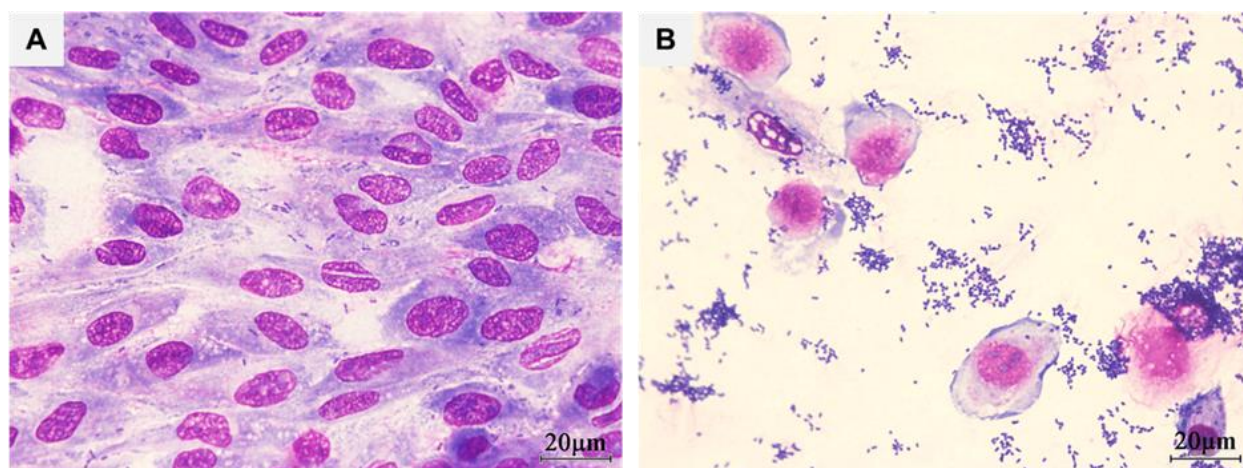


Figura 11 – Adesão bacteriana na cultura de células do estroma após 4 horas de incubação com *E. coli*.

Legenda: **A** - Células incubadas com a estirpe Pyo14.1. A adesão bacteriana ao plástico da placa de cultura é pouco expressiva; **B** – Células incubadas com a estirpe Pyo18. É visível a ausência do tapete celular e a adesão inespecífica da maioria das bactérias.

2.2.2 Internalização

Relativamente ao ensaio de internalização, a percentagem de bactéria internalizada foi sempre inferior a 0,5%, nas células epiteliais e do estroma, em todas as condições experimentais testadas. Na cultura de células epiteliais, após 1 hora de incubação, verificou-se que ambas as estirpes apresentavam uma internalização <100 UFC/ml (0% de bactéria internalizada), em todas as MOI adotadas. Às 4 horas o número médio de bactérias (UFC/ml) internalizadas de Pyo14.1 (5×10^4 UFC/ml) foi superior ao de Pyo18 (< 100 UFC/ml), não tendo variado proporcionalmente com a MOI. A percentagem de internalização de Pyo14.1 foi de 0,2%. Tal como o observado anteriormente, na cultura de células do estroma a quantidade de bactéria internalizada da estirpe

Pyo14.1 foi sempre superior à de Pyo18 (< 100 UFC/ml). Ao expressar os resultados em UFC/ml, tornou-se notória a baixa internalização da estirpe Pyo18 que apresentou constantemente resultados não contabilizáveis nas sementeiras (< 10 colónias), ou seja, o número de UFC/ml foi inferior a 100. No ensaio de internalização no estroma com a estirpe Pyo14.1 à 1 hora pareceu existir uma relação positiva entre MOI e bactéria internalizada (UFC/ml). As culturas incubadas com MOI < 10 , MOI 10-20, e MOI 20-30 apresentaram uma internalização média de $1,65 \times 10^2$ UFC/ml, $2,28 \times 10^3$ UFC/ml, e $3,58 \times 10^3$ UFC/ml, respetivamente. Contudo, ao relacionar estes valores com o número de bactérias que aderiram, verificou-se que a percentagem de internalização não sofreu nenhuma alteração considerável, oscilando entre 0,11% e 0,39%. Às 4 horas o número UFC/ml de Pyo14.1 internalizada não variou proporcionalmente com a MOI, oscilando entre $1,28 \times 10^4$ UFC/ml e $2,94 \times 10^4$ UFC/ml. Embora o número de UFC/ml de Pyo14.1 internalizada tenha aumentado entre a 1 e as 4 horas, a percentagem de internalização manteve-se sem alteração.

3. Transcrição de componentes das vias dos recetores do tipo *Toll*

Esta análise consistiu na avaliação da transcrição relativa de componentes das vias de resposta inata: recetores envolvidos na deteção de bactérias Gram-negativas (TLR4, TLR2 e CD14), fatores de transcrição (NF- κ B, IRF3 e IRF7), interferão tipo I (IFN- β), quimiocinas (IL-8 e CXCL10), citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β). Esta análise foi efetuada em células epiteliais e do estroma estimuladas com Pyo14.1, Pyo18, e LPS e os resultados foram comparados com os obtidos nas células sem estimulação (controlo negativo).

Não serão apresentados resultados da variação da expressão relativa de ARNm de células do estroma incubadas com a estirpe Pyo18 durante 4 horas devido à incapacidade de extrair uma quantidade de ARN total da amostra suficiente para sintetizar ADNc.

3.1 Transcrição de recetores

A transcrição dos genes que codificam para o TLR2, TLR4 e CD14 nas células epiteliais e do estroma não foi alterada pela estimulação (*E. coli*; LPS), com exceção das células do epitélio, nas quais se verificou um aumento de expressão de ARNm do TLR2 de 2,3 *fold* após 4 horas de

incubação com LPS. No entanto, este valor está muito próximo do limiar estabelecido de 2 *fold* para considerar que existem alterações na transcrição.

Apesar de não existirem diferenças na expressão dos transcritos do TLR2, TLR4 e CD14 após estimulação em cada tipo celular, foi notória a existência de uma diferença nos níveis de expressão relativa destes ARNm entre células do estroma e células epiteliais. A transcrição dos genes que codificam para o TLR2 e TLR4 foi, em média, 4 a 8 vezes superior nas células epiteliais, quando comparada com a transcrição nas células do estroma. Também nas células epiteliais a expressão de ARNm do CD14 foi ligeiramente superior (2,5 a 3,5 vezes) em relação à expressão nas células do estroma.

3.2 Transcrição de fatores de transcrição

Verificou-se que o ARNm dos fatores de transcrição analisados foi expresso em ambos os tipos celulares, nas células estimuladas e não estimuladas. Após 1 hora de estimulação, observou-se um ligeiro aumento da transcrição de NF- κ B de aproximadamente 3 *fold*, nas células epiteliais e do estroma estimuladas com Pyo14.1, Pyo18 e LPS em relação ao controlo negativo, que se manteve às 4 horas. O nível de expressão de ARNm dos fatores de transcrição IRF3 e IRF7 nas células epiteliais e do estroma, após estimulação, foi semelhante ao das células não estimuladas.

3.3 Transcrição de quimiocinas

A estimulação de células epiteliais e do estroma com as estirpes Pyo14.1 e Pyo18 levou a um aumento da transcrição de quimiocinas, principalmente pelas células epiteliais (Figura 12).

No caso da quimiocina CXCL10, a transcrição nas células epiteliais estimuladas com Pyo18, Pyo14.1 e LPS, aumentou da 1 hora (20,0, 14,77 e 25,77 *fold*, respetivamente) para as 4 horas (371, 229, e 217 *fold*, respetivamente). Este aumento de transcrito detetado às 4 horas nas células epiteliais foi superior nas células estimuladas com Pyo18, em comparação com as células estimuladas com Pyo14.1 ou LPS. Nas células do estroma, não se observou uma alteração do ARNm da CXCL10 após 1 hora de incubação e às 4 horas de incubação a resposta foi detetada apenas nas células estimuladas com LPS que transcrevem cerca de 4,87 vezes mais que o controlo negativo.

Verificou-se ainda a existência de expressão de ARNm da CXCL10 nos controlos negativos das culturas de células epiteliais (C_t médio de 29) e do estroma (C_t médio de 26).

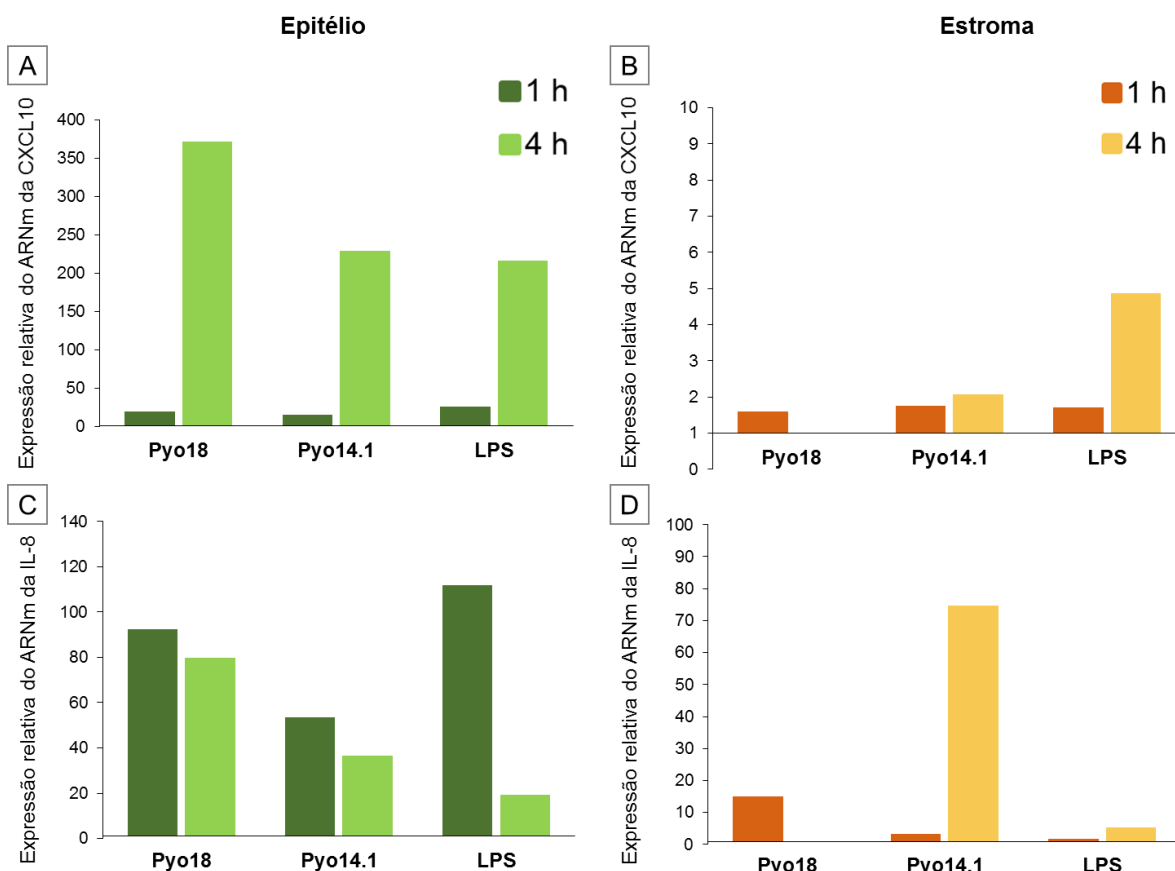


Figura 12 –Expressão relativa do ARNm da CXCL10 e IL-8 após estimulação com *E. coli* e LPS, durante 1 e 4 horas. Os resultados representam diferenças na expressão de ARNm (*fold*) nas células estimuladas relativamente ao calibrador (células não estimuladas).

Legenda: A, B – Expressão relativa de ARNm da CXCL10 em células epiteliais e do estroma, respetivamente. C, D – Expressão relativa de ARNm da IL-8 em células epiteliais e do estroma, respetivamente.

O aumento da expressão do ARNm que codifica para a IL-8 nas células estimuladas foi mais exuberante na cultura de células epiteliais. As diferenças entre células estimuladas com *E. coli* durante 1 e 4 horas são reduzidas, mas o mesmo não ocorre nas amostras estimuladas com LPS. A transcrição relativa das células estimuladas com LPS durante 4 horas sofreu uma redução em cerca de 5,84 vezes quando comparada com a transcrição relativa após 1 hora de estimulação.

Nas células do estroma o aumento da transcrição do gene que codifica para a IL-8, após estimulação, foi mais moderado. No entanto, observou-se um aumento considerável na transcrição de IL-8 após 4 horas de estimulação com Pyo14.1.

Tal como para a CXCL-10, os controlos negativos das culturas de células epiteliais (C_t médio de 25) e do estroma (C_t médio de 23) apresentaram níveis de transcrição de IL-8 acentuados.

3.4 Transcrição de citocinas pró-inflamatórias

A incubação de células epiteliais e do estroma com as estirpes Pyo18 e Pyo14.1 estimulou a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Figura 13).

A transcrição de TNF- α sofreu um grande aumento com a estimulação bacteriana e LPS, sendo este aumento mais pronunciado na cultura de células epiteliais. A transcrição deste gene pelos controlos negativos das culturas de células epiteliais (C_t médio de 31) e do estroma (C_t médio de 33) foi ligeira.

Relativamente à IL-1 β , também se verificou um aumento da expressão de ARNm após estimulação, com exceção das células do estroma incubadas com Pyo18. Nestas ocorreu uma grande redução da transcrição, a qual foi 98% inferior à do controlo (0,02 *fold*). A transcrição deste gene pelos controlos negativos da cultura de células epiteliais foi bastante reduzida (C_t médio de 36), inferior à transcrição na cultura de células do estroma (C_t médio de 30).

O aumento da expressão relativa do ARNm da IL-6 foi superior nas células epiteliais, em comparação com as células do estroma. Nas culturas de células epiteliais a transcrição relativa do gene que codifica para a IL-6 foi inferior após 4 horas de estímulo. Nas células do estroma não se observou alteração na transcrição entre a 1 e as 4 horas. Observou-se transcrição de IL-6 nos controlos negativos das culturas de células epiteliais (C_t médio de 33) e do estroma (C_t médio de 31).

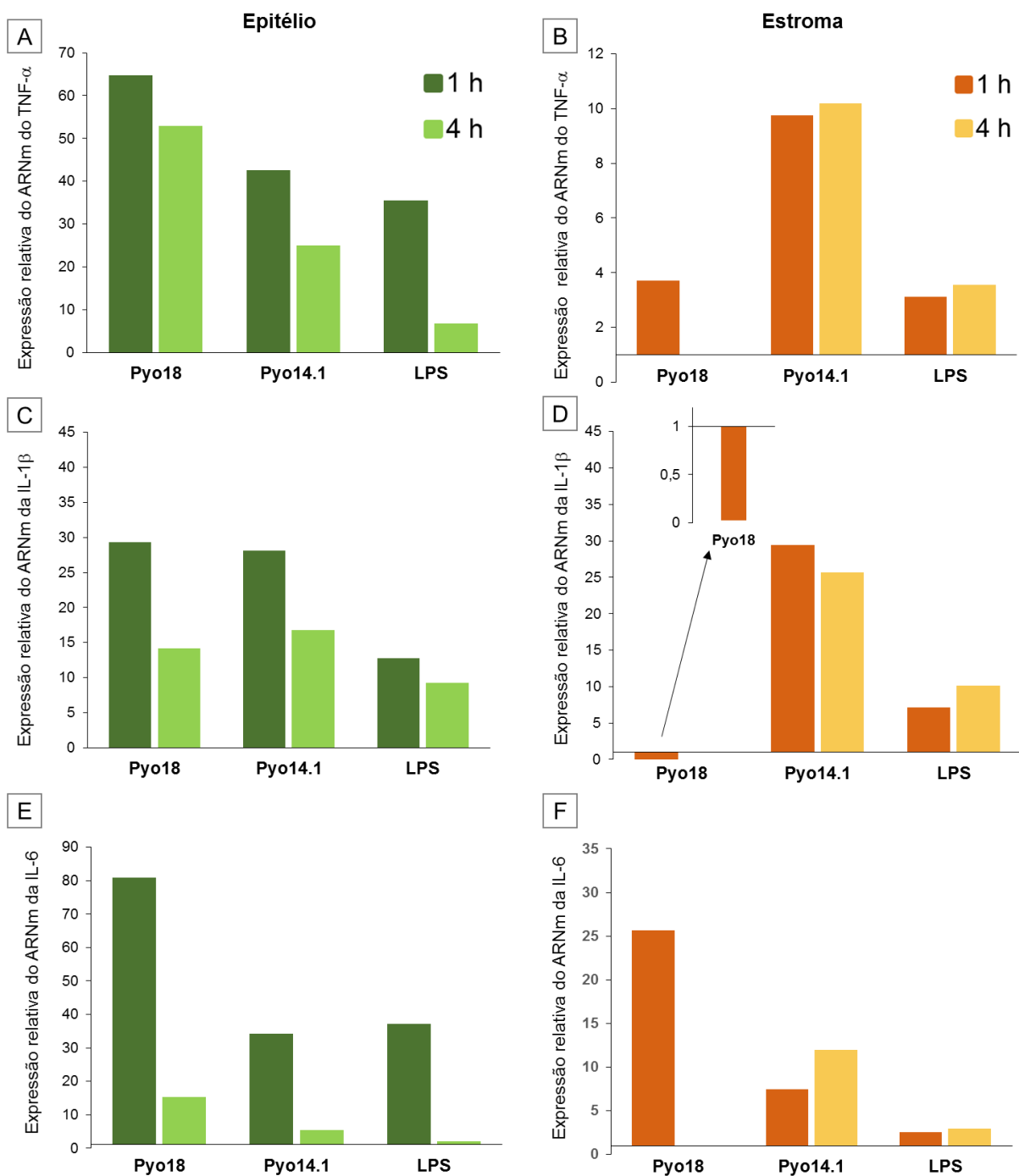


Figura 13 – Expressão relativa do ARNm do TNF- α , IL-1 β e IL-6 após estimulação com *E. coli* e LPS, durante 1 e 4 horas. Os resultados representam diferenças na expressão de ARNm (fold) nas células estimuladas relativamente ao calibrador (células não estimuladas).

Legenda: A, B – Expressão relativa de ARNm do TNF- α em células epiteliais e do estroma, respetivamente; C, D – Expressão relativa de ARNm da IL-1 β em células epiteliais e do estroma, respetivamente. Ampliação da transcrição da região do gráfico que representa a transcrição de IL-1 β pelas células estimuladas com Pyo18 (D); E, F – Expressão relativa de ARNm da IL-6 em células epiteliais e do estroma, respetivamente.

3.5 Transcrição de interferão tipo I

Verificou-se um aumento da transcrição do gene que codifica para o IFN- β nas células epiteliais estimuladas 1 hora com *E. coli* e LPS, ocorrendo uma diminuição acentuada da expressão deste ARNm da 1 hora para as 4 horas de estimulação (Figura 14).

Nas células do estroma a estimulação não aumentou a transcrição do gene que codifica para o IFN- β . Apenas nas células incubadas com a estirpe Pyo14.1 houve um ligeiro aumento de transcrito (2,2 *fold*) (Figura 14). Observou-se transcrição do gene que codifica para o IFN- β nos controlos negativos de células epiteliais (C_t médio de 33) e do estroma (C_t médio de 31).

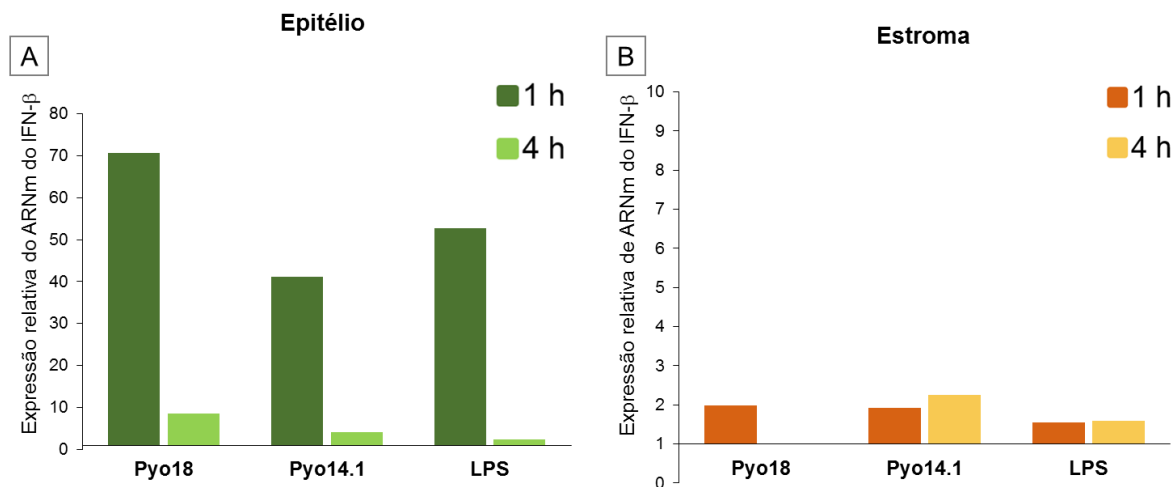


Figura 14 –Expressão relativa do ARNm do IFN- β após estimulação com *E. coli* e LPS durante 1 e 4 horas. Os resultados representam diferenças na expressão de ARNm (*fold*) nas células estimuladas relativamente ao calibrador (células não estimuladas)

Legenda: A, B – Expressão relativa de ARNm do IFN- β em células epiteliais e do estroma, respetivamente.

3.6 Transcrição de citocinas anti-inflamatórias

Não foi detetada transcrição do gene que codifica para IL-10 nas células epiteliais, quer nos controlos negativos quer nas células estimuladas. Nas células do estroma, a estimulação com a estirpe Pyo18 levou a uma diminuição da transcrição do gene que codifica para a IL-10 de 88% (0,12 *fold*), quando comparado com o controlo negativo. A estimulação com a estirpe Pyo14.1 induziu um pequeno aumento da transcrição do gene que codifica para esta citocina anti-inflamatória (2,69 *fold*), mas apenas com 1 hora de estimulação (Figura 15). Nas restantes

condições não se verificou aumento do seu transcrito. Detetou-se transcrição nos controlos negativos da cultura de células do estroma (C_t médio de 30).

A estimulação de ambas as culturas com *E. coli* e LPS não levou à alteração da transcrição do gene que codifica para o TGF- β . Foi detetada transcrição nos controlos negativos quer na cultura de células epiteliais (C_t médio de 29), quer na de células do estroma (C_t médio de 28).

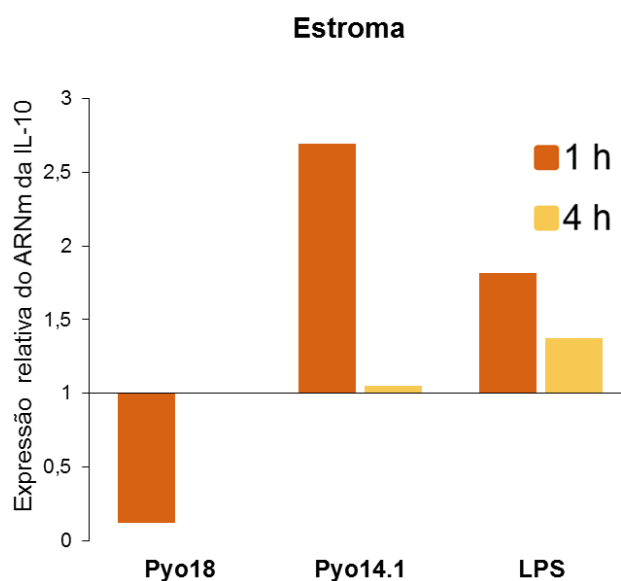


Figura 15 – Expressão relativa do ARNm da IL-10 em células do estroma após estimulação com *E. coli* e LPS, durante 1 e 4 horas. Os resultados representam diferenças na expressão de ARNm (*fold*) nas células estimuladas relativamente ao calibrador (células não estimuladas).

DISCUSSÃO

É grande a complexidade associada à fisiopatologia da piómetra, da qual o agente infeccioso mais comumente isolado é *Escherichia coli* (Mateus & Eilts, 2010; Verstegen *et al.*, 2008). Pouco se conhece acerca dos mecanismos associados à fase inicial desta afeção, uma vez que os estudos existentes apenas traduzem o que ocorre tardiamente no momento do diagnóstico, quando já existe uma extensa infiltração de células de reação inflamatória e uma vasta destruição tecidular (Carvalho, 2014; Hagman, Rönnberg, & Pejler, 2009).

Este estudo teve como objetivo estabelecer um modelo *in vitro* que permitisse estudar as alterações iniciais que estão na génese da infeção bacteriana nos casos de piómetra. Para tal, estabeleceu-se um protocolo que permite o isolamento e cultura primária de células do estroma e epiteliais, o qual possibilita o estudo de interações entre o agente infeccioso e as células do hospedeiro com as quais contacta.

Até à data, estão apenas descritos dois trabalhos de isolamento e purificação de células do endométrio da cadela para cultura em modelo tridimensional (Bartel, Tichy, Schoenky, Aurich & Walter, 2013; Stadler *et al.*, 2009) e um que utiliza o modelo de cultura das células em monocamada (Galabova-Kovacs, Walter, Aurich, & Aurich, 2004). No entanto, os passos de purificação descritos nestes protocolos não nos permitiram o estabelecimento de culturas com um nível de pureza aceitável. Assim sendo, desenvolveu-se um protocolo de isolamento e cultura de células através da adaptação e otimização de alguns procedimentos descritos em estudos anteriores (Bläuer *et al.*, 2005; Stadler *et al.*, 2009). O isolamento e purificação dos dois tipos celulares foram realizados com sucesso por centrifugação seletiva, filtração, sedimentação e, no caso da cultura de fibroblastos, por adesão seletiva dos fibroblastos à placa de cultura antes de ocorrer a adesão das células epiteliais. A escolha na primeira metade de diestro esteve associada com o facto de ser nesta fase que a indução de piómetra *in vivo* é mais eficaz (Tsumagari *et al.*, 2005).

A viabilidade das células epiteliais, depois de finalizado o processo de isolamento, foi inferior à das células do estroma. Isto pode dever-se a um número maior de passos de purificação e à desagregação por ação mecânica e enzimática a que as células epiteliais são submetidas, o que pode ser mais lesivo. Contudo, a viabilidade celular foi satisfatória e suficiente para originar um tapete com aproximadamente 90% de confluência em 3 - 4 dias.

O nível de pureza das culturas de células do estroma e de células epiteliais obtido com o método desenvolvido permitiu o estudo de respostas específicas associadas a cada tipo celular. Após o estabelecimento da cultura primária iniciou-se o estudo das interações entre cada tipo celular *E. coli*, de modo a simular a gênese do processo inflamatório associado à piómetra. Para tal, foram utilizadas duas estirpes de *E. coli*, isoladas de úteros de cadelas com piómetra, com diferente genótipo de virulência.

Contrariamente à estirpe Pyo14.1, a estirpe Pyo18 promoveu um destacamento quase completo do tapete de células do estroma após um período de incubação de 4 horas. O mesmo efeito não foi observado na cultura de células epiteliais. Este resultado pode estar associado à ação de toxinas especificamente produzidas pela estirpe Pyo18, e não sintetizadas pela estirpe Pyo14.1. Num estudo prévio de caracterização do genótipo de virulência de estirpes de *E. coli* isoladas de úteros de cadelas com piómetra (Henriques *et al.*, 2014), foi demonstrado que a estirpe Pyo18 tem no genoma genes que codificam para a α -hemolisina (*hlyA*) e para o fator necrosante citotóxico 1 (*cnf1*), estando estes genes ausentes no genoma da estirpe Pyo14.1. Para além disso, a estirpe Pyo18 apresenta fenótipo hemolítico quando crescida em meio agar suplementado com sangue de carneiro, o qual está associado à capacidade de expressão da α -hemolisina. Os genes que codificam para a α -hemolisina e o fator necrosante citotóxico 1 são os genes para toxinas mais frequentemente detetados no genoma de estirpes de *E. coli* isoladas de cadelas com piómetra, que se pensa estarem envolvidas na destruição do tecido uterino (Henriques *et al.*, 2014; Mateus *et al.*, 2013; Siqueira *et al.*, 2009).

Os efeitos citotóxicos da α -hemolisina de *E. coli*, envolvidos no destacamento do tapete celular, já tinham sido observados em células HeLa (Marques, Abe, Griffin, & Gomez, 1995) e numa linha de células epiteliais da bexiga, T24 (Island *et al.*, 1998). A α -hemolisina insere-se nas membranas celulares, formando poros e causando morte celular em elevadas concentrações (Spurbeck & Mobley, 2013). As células epiteliais uterinas parecem ser mais resistentes ao efeito citotóxico deste fator de virulência, uma vez que o tapete celular, no final das 4 horas de incubação se apresentava quase confluyente. De facto, a incubação das células do estroma durante apenas 1 hora com a estirpe Pyo18 induziu alterações morfológicas no tapete de células compatíveis com o efeito citotóxico da α -hemolisina, nomeadamente o destacamento de parte (25%) do tapete celular e arredondamento celular.

Com o objetivo de confirmar o envolvimento da α -hemolisina no efeito citotóxico observado na cultura de células do estroma, foi construído no nosso laboratório uma estirpe Pyo18 mutante com

perda-de-função do gene *hlyA*. Os resultados obtidos recentemente confirmaram que a α -hemolisina é a responsável pelos efeitos citotóxicos descritos neste estudo. Na piómetra, após a passagem das bactérias através da barreira epitelial, a produção desta exotoxina pela *E. coli* poderá facilitar a invasão do tecido, através de uma maior destruição do estroma endometrial, o que facilita a sua disseminação até aos vasos sanguíneos e às camadas mais profundas do tecido.

Neste estudo, foi avaliada a capacidade de adesão e internalização de cada estirpe ao nível das células epiteliais e do estroma. A adesão é um dos primeiros passos da infeção, e constitui uma etapa crítica que ocorre necessariamente antes da invasão bacteriana e da secreção de algumas toxinas (Letourneau *et al.*, 2011). Por outro lado, a estimulação de produção de citocinas também pode ser induzida após o contacto das adesinas com as células do hospedeiro (Ashkar, Mossman, Coombes, Gyles, & Mackenzie, 2008; Frendéus *et al.*, 2001).

Tal como esperado, *E. coli* aderiu às células epiteliais e do estroma, nas condições *in vitro* estabelecidas. Os resultados de adesão foram expressos em UFC/ml e em percentagem de adesão. A apresentação dos resultados na forma de percentagem de bactérias que aderiu é mais correta, uma vez que atenua possíveis variações associadas à inoculação das bactérias nos poços de cultura e a diferenças entre taxas de crescimento, caso existam (Letourneau *et al.*, 2011). Neste trabalho, não foram observadas diferenças expressivas entre a adesão de *E. coli* às células do estroma e às células epiteliais. Há no entanto que referir que, os ensaios estão sujeitos a alguma variação devido à variabilidade introduzida durante a execução do protocolo em dias diferentes e com a utilização de MOIs ligeiramente diferentes (Letourneau *et al.* 2011).

Os resultados obtidos no ensaio de adesão à 1 hora estão de acordo com os anteriormente descritos para a infeção por *E. coli* de culturas de células do estroma e de células epiteliais de endométrio bovino (Sheldon *et al.* 2010). Estes autores, para uma MOI de 10 e incubação de 1 hora, referem resultados de adesão entre 15 e 35 x 10⁴ UFC/ml, na mesma ordem de grandeza aos obtidos neste trabalho (entre 3 a 120 x 10⁴ UFC/ml, dependendo da MOI utilizada). No entanto, esta comparação dos resultados de adesão é dificultada pelo facto dos resultados serem apenas expressos em UFC/ml e não pela percentagem de adesão. A quantidade de inóculo ou a taxa de crescimento das bactérias podem não ser exatamente as mesmas, o que condiciona o número total de bactérias aderentes. Além disso, os resultados do ensaio de adesão podem variar entre estudos de acordo com o próprio desenho experimental, o número de lavagens ou forma como estas são feitas (Letourneau *et al.*, 2011). Não encontramos estudos nos quais seja avaliada a adesão de *E. coli* em culturas primárias

de endométrio de cadela, apenas existem trabalhos que avaliam a adesão a explantes, mas através de um método diferente (Krekeler *et al.*, 2012, 2013).

A observação de lamelas coradas com Giemsa demonstrou que após 4 horas de incubação com bactéria a especificidade da adesão diminui. O crescimento bacteriano no meio de cultura que ocorre durante 4 horas de incubação, aumenta a probabilidade de as bactérias aderirem inespecificamente à placa de cultura. Estes dados refletem a importância da associação de métodos quantitativos com métodos qualitativos, como a coloração Giemsa, para avaliar a especificidade e o padrão de adesão. Neste ensaio *in vitro*, a adesão parece ser um fenómeno tempo-dependente, mas que está relacionado sobretudo com o crescimento da bactéria no meio de cultura durante o período de incubação, o qual aumenta o número de bactérias disponíveis para aderirem às células. MOIs elevadas levam a uma maior adesão inespecífica ao plástico da placa de cultura, pelo que devem ser evitadas (Letourneau *et al.*, 2011), ocorrendo um fenómeno semelhante com tempos de incubação mais prolongados, tal como explicado acima. Neste estudo foram testadas várias multiplicidades de infeção, mas não foram detetadas diferenças expressivas de adesão entre elas. Seria expectável que uma MOI superior aumentasse sistematicamente a quantidade de bactéria aderente em relação a ensaios utilizando uma MOI inferior. No entanto, a variação entre as MOI utilizadas foi pequena, o que torna qualquer diferença existente pouco expressiva.

No nosso trabalho, a ausência ou a reduzida percentagem de bactéria internalizada pelas células endometriais nas condições *in vitro* estabelecidas leva à sugestão de que o mecanismo de patogenicidade de *E. coli* na piómetra não envolve a invasão das células epiteliais e do estroma, ou seja, não passa por um estilo de vida intracelular.

À semelhança do que foi aqui observado para a estirpe Pyo18, num estudo de infeção de células HeLa e HTB-4 com a estirpe uropatogénica CFT073, capaz de produzir hemolisina, foram obtidos resultados de invasão inferiores a 100 UFC/ml após 2 horas de incubação (Saldaña *et al.*, 2014). A magnitude da internalização da bactéria Pyo14.1 expressa em UFC/ml em células do estroma está também de acordo com os resultados apresentados por Sheldon *et al.* (2010), após 1 e 4 horas de incubação de *E. coli* em culturas de células primárias de endométrio bovino. Sheldon *et al.* (2010) referem também que a invasão celular aumentou ao longo do tempo, o que também se verificou no nosso estudo tendo por base os resultados expressos em UFC/ml após 1 e 4 horas de incubação com bactéria. Este resultado deverá estar associado ao crescimento bacteriano durante o período de incubação, uma vez que no nosso estudo a percentagem de bactéria internalizada relativamente à aderente não aumentou entre a 1 e as 4 horas de incubação.

No que se refere à adesão, e consequentemente internalização, surge também a hipótese de esta ser regulada hormonalmente havendo necessidade de no futuro testar esta hipótese. De acordo com Yasunaga *et al.* (2013) a expressão de monossacáridos como glucose e manose na mucosa uterina ocorre exclusivamente em úteros na fase de diestro com e sem piómetra, o que leva a crer que este é um fenómeno hormonalmente regulado. Estes monossacáridos podem constituir recetores para as adesinas de *E. coli*. No nosso estudo, as células endometriais que foram utilizadas nos ensaios de adesão e internalização são provenientes de úteros em diestro, mas após 3 a 4 dias em cultura, dependendo do tempo de *turnover* dos recetores para as adesinas bacterianas, estes podem já não ser igualmente expressos em relação às células *in vivo*. Assim sendo, seria também interessante em ensaios futuros estimular previamente as células com estrogénio e progesterona, para averiguar *in vitro* a sua influência na adesão e internalização da bactéria às células do hospedeiro.

Este trabalho também teve como intuito avaliar a resposta das células em cultura, no que diz respeito a mecanismos de resposta imunitária inata face à sua interação com *E. coli*. Na resposta a infeções bacterianas por bactérias Gram-negativas, os TLRs 2 e 4 são os de maior relevância (Knapp, 2010). O TLR2 reconhece o peptidoglicano e as lipoproteínas/lipopéptidos presentes em bactérias Gram-negativas (Aliprantis *et al.*, 1999), formando heterodímeros com os recetores TLR6 ou TLR1 (Beutler, 2004). O ligando mais caracterizado do TLR4 é o LPS, que é reconhecido em cooperação com as proteínas CD14, MD-2 e LBP (Kawai & Akira, 2010).

Neste estudo foi avaliada a transcrição relativa dos genes que codificam para o TLR2, TLR4 e CD14. Verificou-se que a estimulação de células epiteliais e do estroma (durante 1 e 4 horas) com *E. coli* não alterou a transcrição destes genes face ao controlo negativo. No entanto, estudos anteriores demonstraram que a transcrição dos genes que codificam para estes recetores está aumentada no endométrio de cadelas com piómetra (Hagman *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010). Este aumento estará provavelmente associado à infiltração do tecido por células de reação inflamatória, principalmente neutrófilos e macrófagos (Silva *et al.*, 2010). São vários os estudos *in vitro*, embora noutros sistemas, com resultados semelhantes aos obtidos no nosso trabalho, em que a estimulação bacteriana não induziu aumento da transcrição destes genes (Fu *et al.*, 2013; Gilbert *et al.*, 2013; Swangchan-Uthai, Lavender, Cheng, Fouladi-Nashta, & Wathes, 2012).

A resposta imunitária das células do hospedeiro é coordenada por uma rede de regulação genética, na qual determinados fatores de transcrição controlam a expressão de um conjunto de genes alvo, que é dependente do tipo de células e da natureza do estímulo celular (Taniguchi, Ogasawara,

Takaoka & Tanaka, 2001). Os fatores de transcrição NF- κ B, IRF3 e IRF7 estão entre os mais importantes que são ativados a partir das vias dependente e independente de MyD88 após a ligação do PAMP ao TLR (Tamura, Yanai, Savitsky & Taniguchi, 2008). Neste estudo, foi detectada a transcrição destes três fatores nas células epiteliais e do estroma do endométrio da cadela em cultura. Este resultado está de acordo com o trabalho de Carvalho (2014), o qual demonstrou que a transcrição de NF- κ B e IRF3 é constitutiva no endométrio de cadelas em diestro. A análise da transcrição relativa do gene que codifica para o NF- κ B mostrou um ligeiro aumento (aproximadamente 3 *fold*) após a estimulação das células com *E. coli* e LPS. Este resultado está de acordo com o estudo de Fu *et al.* (2013), no qual a estimulação de células endometriais bovinas com LPS levou a um aumento da transcrição de NF- κ B em 5,2 *fold* após 3 horas de estímulo. Esta molécula está normalmente sequestrada no citoplasma de células não estimuladas devido a uma família de proteínas inibidoras, as I κ Bs, que se ligam ao NF- κ B impedindo a sua translocação para o núcleo. A indicação de que este fator de transcrição está a ativar as vias de produção de mediadores da inflamação é dada pela sua localização subcelular, uma vez que após estimulação ocorre fosforilação do NF- κ B e degradação proteolítica das I κ Bs, permitindo a sua translocação para o núcleo, onde promove a transcrição de genes que codificam quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (Karin & Ben-Neriah, 2000). Assim sendo, apesar da transcrição do gene que codifica para o NF- κ B poder ser ativada por estimulação, a análise da transcrição não é por si só suficiente para prever que existe ativação das vias de sinalização dependentes deste fator de transcrição, uma vez que é necessária a modificação pós-transcricional dos fatores de transcrição e translocação para o núcleo.

No que diz respeito aos fatores reguladores dos interferões (IRF3 e IRF7), a análise do seu nível de transcrição revelou que não existem diferenças entre células estimuladas e não estimuladas. O IRF3, à semelhança do NF- κ B, é constitutivamente expresso no citoplasma da célula do hospedeiro e após ativação por fosforilação é translocado para o núcleo da célula onde promove a transcrição de IFN tipo I (IFN- α e IFN- β) e de genes induzidos pelos IFNs, como o da CXCL10 (Sato *et al.*, 2000; Yoneyama *et al.*, 1998). O IRF7 também contribui para a indução da transcrição de genes que codificam IFN tipo I (Sato *et al.*, 2000). De acordo com um estudo em fibroblastos embrionários de ratinho, a expressão de ARNm do IRF7 está dependente da sinalização de IFN- α /IFN- β e não possui um carácter constitutivo como a transcrição do gene que codifica para o IRF3 (Sato *et al.*, 1998). No nosso trabalho, o estímulo nos períodos de tempo estudados não induziram um aumento da transcrição do gene que codifica para o IRF7, apesar de se ter verificado um

aumento da transcrição do gene do IFN- β . A produção proteica de IFN- β pode ter sido insuficiente para ativar as vias que culminam na indução da transcrição de IRF7 ou este constitui um fenómeno que não ocorre nos tipos celulares estudados ou nas condições de cultura estabelecidas.

Neste estudo foi também analisada a transcrição das quimiocinas IL-8 e CXCL10, das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL8 e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β e de IFN- β . As quimiocinas são moléculas importantes para a quimiotaxia e ativação de leucócitos (Borish & Steinke; Murphy, 2013). No presente trabalho, detetou-se um aumento da transcrição dos genes que codificam para IL-8 e CXCL10 após estimulação com *E. coli* e LPS, em relação ao controlo negativo. O aumento de transcrito foi superior na cultura de células epiteliais estimuladas, em comparação com o acréscimo da transcrição de quimiocinas na cultura de células do estroma. Segundo o trabalho de Carvalho (2014), foi detetado um aumento da expressão de ARNm da IL-8 no endométrio de cadelas com piómetra, em relação ao endométrio de cadelas em diestro não patológico. Adicionalmente, de acordo com Hagman *et al.* (2009), num estudo em que foi utilizada a técnica de *microarrays*, o aumento da transcrição dos genes que codificam para IL-8 e CXCL10 estavam entre os maiores incrementos de transcrição no útero de cadelas com piómetra, relativamente a úteros em diestro. Além das células epiteliais e do estroma, as células endoteliais e as células de reação inflamatória são responsáveis pela produção destas quimiocinas (Akdis *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011). São vários os estudos *in vitro* que apoiam os resultados do nosso trabalho no que se refere à estimulação com LPS. De acordo com Fu *et al.*, (2013), após estimulação de células epiteliais do endométrio bovino com LPS também ocorreu um aumento da transcrição de IL-8. Num estudo de Cronin, Turner, Goetze, Bryant e Sheldon (2012) em cultura de células do estroma e de células epiteliais estimuladas durante 6 horas com LPS, verificou-se um aumento da transcrição nas células epiteliais (87 *fold*) superior ao aumento observado nas células do estroma (9,5 *fold*), o que está de acordo com os nossos resultados, nos quais a resposta em relação ao estímulo ocorre predominantemente nas células epiteliais. Particularmente no caso da CXCL10, a transcrição aumentou notavelmente da 1 para as 4 horas de estímulo. Isto pode dever-se, por exemplo, a uma produção de determinadas toxinas que estimulem a produção de CXCL10 numa fase mais tardia de incubação. Por outro lado algumas citocinas que são produzidas nas primeiras horas de incubação podem atuar posteriormente de forma autócrina ou parácrina, de forma a estimular a transcrição do gene que codifica para a CXCL10. Um estudo com células epiteliais mamárias bovinas demonstrou que ocorreu um aumento de transcrito da CXCL10 após estimulação

das células com LPS e também após a estimulação com IFN- β recombinante humano (Gilbert *et al.*, 2013). No nosso trabalho a transcrição do gene que codifica para o IFN- β também está bastante aumentada nas células epiteliais após 1h de estímulo, ao contrário do que acontece nas células do estroma. A produção de IFN- β poderá estar relacionada com o aumento mais tardio da transcrição de CXCL10, no entanto seriam necessários estudos adicionais para averiguar esta possibilidade. Estes resultados sugerem que as células epiteliais poderão ter um papel importante na quimiotaxia e ativação de células de reação inflamatória como neutrófilos, linfócitos e macrófagos. As células epiteliais podem contribuir em parte para a extensa infiltração do endométrio por células de reação inflamatória, que constitui uma das características histológicas observadas no útero de cadelas com piómetra (Carvalho, 2014; Dow, 1957, 1958).

A produção de IFN- β foi durante muito tempo associada a infeções virais, no entanto estudos mais recentes revelam que pode ser produzido em resposta a infeções por bactérias Gram-negativas, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* e *Legionella pneumophila* (Bauler, Chase, & Bosio, 2011; Carrigan *et al.*, 2010; Monroe, McWhirter, & Vance, 2009), entre outras. Neste estudo, após o aumento observado da expressão de ARNm do IFN- β nas células epiteliais, os níveis de transcrição diminuíram drasticamente após 4 horas de estimulação. Isto sugere que transcrição de IFN- β pode ser um fenómeno que ocorre sobretudo no início da resposta inflamatória nas células epiteliais uterinas, tendendo a diminuir posteriormente. De facto, num estudo *in vitro* em macrófagos humanos estimulados com LPS verificou-se a existência de um aumento do ARNm do IFN- β no primeiro ponto temporal de análise, às 4 horas com posterior atenuação deste aumento em pontos temporais mais tardios como às 8 ou 12 horas pós-estimulação (Reimer, Brcic, Schweizer, & Jungi, 2008). Também um estudo *in vivo* baseado na indução experimental de infeção pulmonar em ratinho revelou que 4 horas após a infeção com *Pseudomonas aeruginosa* ocorreu um aumento da expressão de ARNm de IFN- β , o qual retornava praticamente a níveis basais em 24 horas (Carrigan *et al.*, 2010). Embora nestes estudos não tenha sido analisada a transcrição do gene que codifica para o IFN- β em tempos tão precoces como no nosso trabalho, os resultados apoiam a diminuição relativamente rápida da transcrição deste com a progressão do tempo de estimulação ou infeção. O presente estudo suporta a ideia de que o IFN- β é produzido no útero da cadela com piómetra em resposta à infeção por *E. coli* numa fase inicial do processo infeccioso. Numa fase mais tardia, não foi detetada a transcrição de IFN- β no endométrio de úteros com piómetra (Carvalho, 2014; Hagman *et al.* 2009;). O papel desta citocina nas infeções bacterianas

ainda não é totalmente conhecido, mas estudos indicam que inibe a replicação intracelular de bactérias (De la Maza, Peterson, Goebel, Fennie, & Czarniecki, 1985; Plumlee *et al.*, 2009) e especula-se que também possa estar envolvido na ativação de células NK, de células dendríticas e na produção de anticorpos (Trinchieri, 2010). Num contexto biológico de piômetra, a indução da transcrição, e eventualmente expressão, deste gene numa fase muito precoce da infecção poderá estar associada a uma rápida ativação da população de células de reação inflamatória já presente no útero em diestro sem afeção.

De um modo geral, a estimulação das células epiteliais e do estroma com *E. coli* e LPS induziu um aumento da transcrição dos genes que codificam para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. O aumento significativo do ARNm destas citocinas no endométrio de cadelas com piômetra, em comparação com endométrio de úteros de cadelas em diestro sem afeção também foi observado por Hagman *et al.* (2009) e Carvalho (2014). A indução destas citocinas em culturas primárias de células endometriais de origem bovina foi observada após estimulação com LPS (Cronin *et al.* 2012; Fu *et al.* 2013).

No nosso estudo, verificou-se uma diminuição da expressão de ARNm da IL-1 β nas células do estroma estimuladas com a estirpe Pyo18 em comparação com as células não estimuladas. O mesmo não se verificou nas células do estroma incubadas com Pyo14.1 e nas células epiteliais. Tal facto poderá estar relacionado com a produção de determinado(s) fator(es) de virulência envolvido(s) na subversão das defesas do hospedeiro produzidos apenas pela estirpe Pyo18, e que podem atuar preferencialmente nas células do estroma. A α -hemolisina é um dos fatores de virulência descritos como sendo capazes de subverter as defesas do hospedeiro (Dhakal & Mulvey, 2012). Esta toxina é capaz de provocar alterações de componentes-chave associados à sinalização celular do NF- κ B (Dhakal & Mulvey, 2012). Hilbert *et al.* (2012), num estudo em que procuravam esclarecer o efeito de inibição de citocinas inflamatórias pela α -hemolisina, criaram um mutante com deleção do gene *hlyA*. Com o intuito de repor o fenótipo hemolítico utilizou-se um vetor de expressão que codifica uma ilha genómica, PAI I_{J96}, a qual contém o operão necessário para a síntese de α -hemolisina. Inesperadamente, num modelo *in vivo* de infecção do trato urinário, esta estirpe induziu níveis de transcrição de IL-1 β e IL-10 mais baixos que o *wild type* (estirpe uropatogénica F11). Verificou-se que esta estirpe era mais hemolítica que a F11, o que sugere que uma produção excessiva de hemolisina pode interferir com a produção de IL-1 β e IL-10 pelas células do hospedeiro. Assim, a inibição da transcrição do gene da IL-1 β em células do estroma

especificamente infetadas com Pyo18 poderá ser justificada pela ação da α -hemolisina na subversão do sistema das defesas do hospedeiro. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar esta hipótese.

Em relação à transcrição das citocinas anti-inflamatórias analisadas, não se verificou alteração da transcrição do gene que codifica para o TGF- β em ambos os tipos celulares em resposta à estimulação por *E. coli*. No que se refere ao gene que codifica para a IL-10, a sua transcrição foi detetada apenas nas células do estroma. Neste tipo celular, a estimulação com a estirpe Pyo18 inibiu a transcrição da IL-10 e a estimulação com Pyo14.1 promoveu um ligeiro aumento da transcrição após 1h de incubação (aumento de cerca de 2,6 *folds*). Carvalho (2014) detetou um aumento da expressão de ARNm da IL-10 e do TGF- β no endométrio de úteros de cadelas com piómetra, comparativamente a úteros de diestro não patológico. Esta observação pode dever-se à presença das células de reação inflamatória que infiltram extensamente o endométrio de cadelas com piómetra. O facto de não haver alteração do nível de expressão de ARNm das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e do TGF- β nas células epiteliais durante as 4 horas de incubação, pode sugerir que esta resposta seja mais tardia do que a resposta pró-inflamatória desencadeada por estas células. A diminuição da transcrição do gene que codifica para a IL-10 nas células do estroma infetadas com a estirpe Pyo18, poderá ser explicada pela ação da α -hemolisina na subversão das defesas do hospedeiro, tal como acima referido para a IL-1 β . Através deste trabalho também é possível perceber que o LPS é um componente estrutural da *E. coli* muito importante para a indução da transcrição de todas as citocinas e quimiocinas analisadas. No entanto, outros componentes estruturais de *E. coli* podem constituir PAMPs que contribuem para a estimulação da produção de mediadores inflamatórios.

Tal como já referido para a adesão, também aqui seria interessante perceber a influência da estimulação com hormonas esteroides ováricas na transcrição dos genes que codificam para efetores das vias dos TLRs.

O modelo *in vitro* estabelecido neste trabalho parece ser adequado para estudar a resposta imunitária inata desenvolvida pelas células epiteliais e do estroma face ao contacto com agente patogénico. É de evidenciar que nos controlos negativos foi observada transcrição de todos os efetores das vias dos TLRs estudados. No endométrio de úteros sem alteração patológica na fase de diestro foi detetada a transcrição dos genes que codificam para IL-6, IL-8 e IL-10 (Carvalho, 2014), pelo que a deteção da sua transcrição *in vitro* parece mimetizar o que ocorre *in vivo*. A

transcrição de outros genes avaliados neste trabalho pode ter sido induzida pelas condições de cultura e pelo *stress* celular associado à manipulação realizada durante os ensaios de infecção, por um processo denominado de inflamação estéril. A libertação de padrões moleculares associados a lesões celulares (DAMPs) e a sua ligação a PRRs como os TLRs faz com que a transcrição de genes que codificam citocinas e quimiocinas seja ativada, ainda que em condições de esterilidade. Os DAMPs são moléculas que normalmente estão sequestradas no interior da célula, e que por isso ao serem libertadas são reconhecidas como *non self*, de uma forma semelhante ao que ocorre com os PAMPs (Chen, & Nuñez, 2010). No entanto, como foi observado, esta transcrição associada ao reconhecimento de DAMPs é de magnitude inferior à do estímulo com *E. coli* ou LPS.

Embora o epitélio seja a primeira barreira com a qual o agente patogénico contacta, este estudo evidencia que as células do estroma desempenham um papel bastante importante no desenvolvimento da resposta inflamatória. Por serem células que estão presentes em maior quantidade que as epiteliais, podem fazer uma maior contribuição para a inflamação após a invasão do tecido por *E. coli*. Além disso, as células do estroma têm também uma proximidade mais chegada às estruturas vasculares e às células mononucleares existentes, podendo contribuir para a ativação de outras células através da produção de citocinas pró-inflamatórias.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estabelecido um modelo *in vitro*, utilizando culturas primárias de células epiteliais e do estroma do endométrio, útil para o estudo das fases iniciais de infecção por *E. coli*, no âmbito da infecção uterina. A reduzida internalização de ambas as estirpes nas células epiteliais e do estroma sugere que esta não é uma estratégia de patogenicidade utilizada pela bactéria para invadir o tecido endometrial após efetuar o processo de adesão.

Através da análise da transcrição de citocinas e quimiocinas, foi ainda possível compreender que não só as células epiteliais, como também as células do estroma, desempenham um papel importante no desencadear da resposta imunitária inata no útero. As células do estroma responderam à estimulação com *E. coli* principalmente através da transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, enquanto que as células epiteliais aumentaram a transcrição de genes que codificam IFN- β , citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas.

Foi também observado que estirpes com diferente genótipo de virulência induzem respostas imunitárias diferentes nas culturas de células. Em estudos futuros seria interessante averiguar a importância de alguns dos fatores de virulência de *E. coli* no desencadear da resposta imunitária, tendo por base o modelo estabelecido, bem como se essa resposta é ou não mediada pela progesterona.

BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. (2003). *Cellular and molecular immunology, updated edition* (5^a ed.). Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders.

Aflatoonian, R., & Fazeli, A. (2008). Toll-like receptors in female reproductive tract and their menstrual cycle dependent expression. *Journal of Reproductive Immunology*, 77 (1), 7-13.

Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E.,... Akdis, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127 (3), 701-721. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.050.

Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2 (8), 675-680.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-738.

Aliprantis, A. O., Yang, R.-B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., ... Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285, 736-739.

Amjadi, F., Salehi, E., Mehdizadeh, M., & Aflatoonian, R. (2014). Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Advanced Biomedical Research*. doi: 10.4103/2277-9175.124626.

Ashkar, A. A., Mossman, K. L., Coombes, B. K., Gyles, C. L., & Mackenzie, R. (2008). FimH adhesin of type 1 fimbriae is a potente inducer of innate antimicrobial responses which requires TLR4 and type 1 interferon signaling. *PLoS Pathogens*, 4 (12): e1000233. doi:10.1371/journal.ppat.1000233.

Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27 (2-3), 215-237.

Bäckhed, F., Alsen, B., Roche, N., Angström, J., Von Euler, A., Breimer, M. E., ... Richter-Dahlfors, A. (2002). Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (20), 18198-18205.

Barsanti, J. A. (2006). Genitourinary infections. In C. E. Greene (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and the Cat* (3^a ed., pp. 935-961). St Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Bartel, C., Tichy, A., Schoenkylp, S., Aurich, C., & Walter, I. (2013). Effects of steroid hormones on differentiated glandular epithelial and stroma cells in a three dimensional cell culture model of the canine endometrium. *BMC Veterinary Research*, 9. doi: 10.1186/1746-6148-9-86.

Bauler, T. J., Chase, J. C., & Bosio, C. M. (2011). IFN- γ mediates suppression of IL-12p40 in human dendritic cells following infection with virulent *Francisella tularensis*. *Journal of Immunology*, 187 (4), 1845-1855.

Bélangier, L., Garenaux, A., Harel, J., Boulianne, M., Nadeau, E., & Dozois, C. M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62 (1), 1-10. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00797.x.

Beutler, B. (2004). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, 40 (12), 845-859.

Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*. doi: 10.1155/2012/681473.

Bläuer, M., Heinonen, P. K., Martikainen, P. M., Tomás, E., & Ylikomi, T. (2005). A novel organotypic culture model for normal human endometrium: Regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Human Reproduction*, 20 (4), 864-871.

Boquet, P. (2001). The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*, 39 (11), 1673-1680.

Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). Cytokines and chemokines. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 460-475.

Braun, V., & Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Sciences*, 24 (3), 104-109.

Brayman, M., Thathiah, A., & Carson, D. D. (2004). MUC1: A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, doi:10.1186/1477-7827-2-4.

Brito, B. G., Vidotto, M. C., Berbel, M. M., & Tagliari, K. C. (2004). Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas – UPEC para suínos. *Ciência Rural*, 34(2), 645-652.

Carrigan, S. O., Junkins, R., Yang, Y. J., MacNeil, A., Richardson, C., Johnston, B., & Lin, T. -J. (2010). IFN regulatory factor 3 contributes to the host response during *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *The Journal of Immunology*, 185 (6), 3602-3609. doi: 10.4049/jimmunol.0903429.

Carvalho, S. I. C. V. (2014). *Caracterização imunohistoquímica e molecular de amostras de endométrio de cadela com piômetra*. Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular em Saúde. Caparica: Escola Superior de Saúde Egas Moniz.

Cavaleri, S. J., Bohach, G. A., & Snyder, I. S. (1984). *Escherichia coli* α -hemolysin: Characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiological Reviews*, 48 (4), 326-343.

Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature Reviews – Immunology*, 10 (12), 826-837.

Chen, Y. M., Wright, P. J., Lee, C. S., & Browning, G. F. (2003). Uropathogenic virulence factors in isolates of *Escherichia coli* from clinical cases of canine pyometra and feces of healthy bitches. *Veterinary Microbiology*, 94 (1), 57-69.

Chotimanukul, S., & Sirivaidyapong, S. (2011). Differential expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in healthy and infected canine endometrium. *Theriogenology*, 76 (6), 1152-1161. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.05.024.

Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H.,...Miethke, T. (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nature Medicine*, 14 (4), 399-406. doi: 10.1038/nm1734.

Cronin, J. G., Turner, M. L., Goetze, L., Bryant, C. E. & Sheldon, M. (2012). Toll-like receptor 4 and MyD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biology of Reproduction*, 86 (2). doi: 10.1095/biolreprod.111.092718.

Cruz, S. A. F. (2011). *Proliferação e apoptose celular no endométrio da cadela*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

De Bosschere, H., Ducatelle, R., & Tshamala, M. (2003). Uterine oestrogen and progesterone receptor expression in experimental pyometra in the bitch. *Journal of Comparative Pathology*, 128 (2-3), 99-106.

De Bosschere, H., Ducatelle, R., Tshamala, M., & Coryn, M. (2002). Changes in sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. *Theriogenology*, 58 (6), 1209-1217.

De Bosschere, H., Ducatelle, R., & Tshamala, M. (2002). Is mechanically induced cystic endometrial hyperplasia (CEH) a suitable model for study of spontaneously occurring CEH in the uterus of the bitch?. *Reproduction in Domestic Animals*, 37 (3), 152-157.

De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Simoens, P., & Coryn, M. (2002). Estrogen- α and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Animal Reproduction Science*, 70 (3-4), 251-259.

De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W., & Coryn, M. (2001). Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: Should the two entities be disconnected?. *Theriogenology*, 55 (7), 1509-1519.

De Cock, H., Ducatelle, R., Tilmant, K., & De Schepper, J. (2002). Possible role for insulin-like growth factor-I in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 57 (9), 2271-2287.

De Cock, H., Vermeirsch, H., Ducatelle, R., & De Schepper, J. (1997). Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. *Theriogenology*, 48 (6), 1035-1047.

De la Maza, L. M., Peterson, E. M., Goebel, J. M., Fennie, C. W., & Czarniecki, C. W. (1985). Interferon-induced inhibition of *Chlamydia trachomatis*: dissociation from antiviral and antiproliferative effects. *Infection and Immunity*, 47 (3), 719-722.

Dhakal, B. K., & Mulvey, M. A. (2012). The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host & Microbe*, 11 (1), 58-69. doi: 10.1016/j.chom.2011.12.003.

Dhaliwal, G. K., England, G. C., & Noakes, D. E. (2002). The effects of endometrial scarification on uterine steroid receptors, bacterial flora and histological structure in the bitch. *Animal Reproduction Science*, 69 (3-4), 239-249.

Dhaliwal, G. K., England, G. C., & Noakes, D.E. (1999). The influence of exogenous steroid hormones on steroid receptors, uterine histological structure and the bacterial flora of the normal bitch. *Animal Reproduction Science*, 56 (3-4), 259-277.

Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 27, 519-550. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.

Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118 (2), 503-508.

Dobrindt, U., & Hacker, J. (2008). Targeting virulence traits: Potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. *Current Opinion in Microbiology*, 11 (5), 409-413. doi: 10.1016/j.mib.2008.09.005.

Dow, C. (1958). The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Veterinary Record*, 70 (49), 1102-1108.

Dow, C. (1957). The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *The Veterinary Record*, 69 (50), 1409-1414.

Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B. N., Hedhammar, A., Olson, P., & Lagerstedt, A. S. (2001). Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15 (6), 530-538.

Emödy, L., Kerényi, M., & Nagy, G. (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 29-33.

England, G. (2009). Infertility and subfertility in the bitch and queen. In D. E. Noakes, T. J. Parkinson & G. C. W. England (Ed.). *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (9^a ed., pp. 657-662) Londres, Reino Unido: Saunders Elsevier

England, G. (2001). The reproductive Tract and Neonate. In I. K. Ramsey & B. J. Tennant (Ed.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Infectious Diseases* (pp.185-195). Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Fabbri, A., Travaglione, S., & Fiorentini, C. (2010). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): Toxin biology, *in vivo* applications and therapeutic potential. *Toxins*, 2, 283-296. doi: 10.3390/toxins2020283.

Faldyna, M., Laznicka, A., & Toman, M. (2001). Immunosuppression in bitches with pyometra. *The Journal of Small Animal Practice*, 42 (1), 5-10.

Falzano, L., Fiorentini, C., Donelli, G., Michel, E., Kocks, C., Cossart, P., ...Boquet, P. (1993). Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor type 1. *Molecular Microbiology*, 9 (6), 1247-1254.

Fang., H., Wu, Y., Huang, X., Wang, W., Ang, B., Cao, X., & Wan, T. (2011). Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for hsp70-like protein (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (35), 30393-30400. doi: 10.1074/jbc.M111.266528.

Feghali, C. A., & Wright, T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience*, 2, 12-26.

Feldman, E.C., & Nelson, R. W. (2004). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction* (3^a ed). St Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Fiorentini, C., Fabbri, A., Matarrese, P., Falzano, L., Boquet, P., & Marloni, W. (1997). Hindrance of apoptosis and phagocytic behavior induced by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1: Two related activities in epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241 (2), 341-346.

Frendéus, B., Wachtler, C., Hedlund, M., Fischer, H., Samuelsson, P., Svensson, M., & Svanborg, C. (2001). *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Molecular Microbiology*, 40 (1), 37-51.

Fu, Y., Liu, B., Feng, X., Liu, Z., Liang, D., Li, F., ...Yang, Z. (2013). Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 151, 20-27. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.09.039.

Fukuda, S. (2001). Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. *Experimental Animals*, 50 (4), 325-329.

Galabova-Kovacs, G., Walter, I., Aurich, C., & Aurich, J. E. (2004). Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under *in vitro* conditions. *Theriogenology*, 61 (5), 963-976.

García-Gómez, E., González-Pedrajo, B., & Camacho-Arroyo, I. C. (2013). Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2013/928290.

Gérard, N., Caillaud, M., Martoriati, A., Goudet, G., & Lalmanach, A. C. (2004). The interleukin-1 system and female reproduction. *The Journal of Endocrinology*, 180 (2), 203-212.

Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., & Madara, J. L. (2001). Cutting edge: Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *Journal of Immunology*, 167 (4), 1882-1885.

Gibson, A., Dean, R., Yates, D., & Stavisky, J. (2013). A retrospective study of pyometra at five RSPCA hospitals in the UK: 1728 cases from 2006 to 2011. *Veterinary Record*, 173 (16). doi: 10.1136/vr.101514.

Gilbert, F. B., Cunha, P., Jensen, K., Glass, E. J., Foucras, G., Robert-Granié, C., Rupp, R., & Rainard, P. (2013). Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Veterinary Research*, 44 (40), <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/40>.

Goñi, F. M., & Ostolaza, H. (1998). *E. coli* α -hemolysin: A membrane-active protein toxin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31 (8), 1019-1034.

Guyer, D. M., Gunther IV, N. W., & Mobley, H. L. (2001). Secreted proteins and other features specific to uropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 183 (1), 32-35.

Hagman, R. (2012). Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 323-325. doi: 10.1111/rda.12031.

Hagman, R., Lagerstedt, A. S., Hedhammar, A., & Egenvall, A. (2011). A breed-matched case control study of potential risk-factors for canine pyometra. *Theriogenology*, 75 (7), 1251-1257. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.038.

Hagman, R., Rönnberg, E., & Pejler, G. (2009). Canine uterine bacterial infection induces upregulation of proteolysis-related genes and downregulation of homeobox and zinc finger factors. *PLoS One*, 4 (11): e8039. doi:10.1371/journal.pone.0008039.

Hagman, R., Kindahl, H., & Lagerstedt, A. S. (2006). Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F_{2 α} metabolite levels. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 47, 55-67.

Hagman R. (2004). *New aspects of canine pyometra – studies on epidemiology and pathogenesis*. Doctoral thesis, Veterinaria 182, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.

Hagman, R., & Kühn, I. (2002). *Escherichia coli* strains isolated from the uterus and urinary bladder of bitches suffering from pyometra: Comparison by restriction enzyme digestion and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 84 (1-2), 143-153.

Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., & Matsushima, K. (1994). Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of Leucocyte Biology*, 56 (5), 559-564.

Harvey, M. (2004). Conditions of the non-pregnant female. In: G. M. Simpson, G. C. W. England, & M. Harvey (Eds.) *BSAVA Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology* (2^a Ed., pp. 35-53). United Kingdom: British Small Animal Veterinary.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., ... Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., ... Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 740-745.

Henriques, S., Silva, E., Lemsaddek, A., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2014). Genotypic and phenotypic comparison of *Escherichia coli* from uterine infections with different outcomes: Clinical metritis in the cow and pyometra in the bitch. *Veterinary Microbiology*, 170 (1-2), 109-116. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.021.

Hilbert, D. W., Paulish-Miller, T. E., Tan, C. K., Carey, A. J., Ulett, G. C., Mordechai, E., ... Trama, J. P. (2012). Clinical *Escherichia coli* isolates utilize alfa-hemolysin to inhibit *in vitro* epithelial cytokine production. *Microbes and Infection*, 14, 628-638. doi: 10.1016/j.micinf.2012.01.010.

Hirsh, D. C. (2003). *Escherichia*. In: D. C. Hirsh & Y. C. Zee (Eds.), *Microbiologia Veterinária* (2^a ed., pp. 63-66). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Horne, A. W., Stock, S. J., & King, A. E. (2008). Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction*, 135 (6), 739-749. doi: 10.1530/REP-07-0564.

Ishiguro, K., Baba, E., Torii, R., Tamada, H., Kawate, N., Hatoya, S., ... Inaba, T. (2007). Reduction of mucin-1 gene expression associated with increased *Escherichia coli* adherence in the canine uterus in the early stage of dioestrus. *Veterinary Journal*, 173 (2), 325-332.

Island, M. D., Cui, X., Foxman, B., Marrs, C. F., Stamm, W. E., Stapleton, A. E., & Warren, J. W. (1998). Cytotoxicity of hemolytic, cytotoxic necrotizing factor 1-positive and -negative *Escherichia coli* to human T24 bladder cells. *Infection and Immunity*, 66 (7), 3384-3389.

Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (1), 80-128.

Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: Saunders.

Jonas, D., Schultheis, B., Klas, C., Krammer, P. H., & Bhakdi, S. (1993). Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infection and Immunity*, 61 (5), 1715-1721.

Jungi, T. W., Farhat, K., Burgener, I. A., & Werling, D. (2011). Toll-like receptors in domestic animals. *Cell and Tissue Research*, 343 (1), 107-120. doi: 10.1007/s00441-010-1047-8.

Kannaki, T. R, Shanmugam, M, & Verma, P. C. (2011). Toll-like receptors and their role in animal reproduction. *Animal Reproduction Science*, 125, 1-12. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.03.008.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews – Microbiology*, 2 (2), 123-140.

Karin, M, & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- κ B activity. *Annual Review of Immunology*, 18, 621-663.

Karlsson, I., Hagman, R., Johannisson, A., Wang, L., Karlstam, E., & Wernersson, S. (2012). Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 337-341. doi: 10.1111/rda.12034.

Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34 (5), 637-650. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.

Kawai, T, & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11 (5), 373-384. doi: 10.1038/ni.1863.

Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13 (5), 816-825.

Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., & Zinkernagel, R. M. (2005). *Medical Microbiology* (10^a ed). New York, NY: Thieme.

Kempisty, B., Bukowska, D., Wozna, M., Piotrowska, H., Jackowska, M., Zuraw, A.,...Nowicki, M. (2013). Endometritis and pyometra in bitches: A review. *Veterinari Medicina*, 58 (6), 289-297.

Kida, K., Maezono, Y., Kawate, N., Inaba, T., Hatoya, S., & Tamada, H. (2010). Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , and epidermal growth factor receptor expression and localization in the canine endometrium during the estrous cycle and in bitches with pyometra. *Theriogenology*, 73 (1), 36-47. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.08.002.

Kida, K., Baba, E., Torii, R., Kawate, N., Hatoya, S., Wijewardana, V.,...Inaba, T. (2006). Lactoferrin expression in the canine uterus during the estrous cycle and with pyometra. *Theriogenology*, 66 (5), 1325-1333.

King, A. E., Critchley, H. O., & Kelly, R. W. (2003). Innate immune defences in the human endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*. doi:10.1186/1477-7827-1-116.

Klemm, P., Ørskov, I., & Ørskov, F. (1982). F7 and type 1-like fimbriae from three *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections: Protein chemical and immunological aspects. *Infection and Immunity*, 36 (2), 462-468.

Knapp, S. (2010). Update on the role of toll-like receptors during bacterial infections and sepsis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 160, 107-111. doi: 10.1007/s10354-010-0765-6.

Köhler, C. D., & Dobrindt, U. (2011). What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *International Journal of Medical Microbiology*, 301 (8), 642-647. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.006.

Krekeler, N., Marenda, M. S., Browning, G. F., Holden, K. M., Charles, J. A., & Wright, P. J. (2013). The role of type 1, P and S fimbriae in binding of *Escherichia coli* to the canine endometrium. *Veterinary Microbiology*, 164 (3-4), 399-404. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.028.

Krekeler, N., Marenda, M. S., Browning, G. F., Holden, K. M., Charles, J. A., & Wright, P. J. (2012). Uropathogenic virulence factor FimH facilitates binding of uteropathogenic *Escherichia coli* to canine endometrium. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35 (5), 461-467. doi: 10.1016/j.cimid.2012.04.001.

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30 (1), 16-34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976.

Le Bouguénec, C. (2005). Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 471-478.

Leonard, W. J. (2003). Type I cytokines and interferons and their receptors. In W. E. Paul (Ed), *Fundamental Immunology* (5^a ed., pp. 701-747). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Letourneau, J., Levesque, C., Berthiaume, F., Jacques, M., & Mourez, M. (2011). *In vitro* assay of bacterial adhesion onto mammalian epithelial cells. *Journal of Visualized Experiments*, 51. <http://www.jove.com/details.php?id=2783>, doi: 10.3791/2783.

Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N. O., & Stiles, J. K. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22 (3), 121-130. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.06.001.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method. *Methods*, 25 (4), 402-408.

Mateus, L., Henriques, S., Merino, C., Pomba, C., Lopes da Costa, L., & Silva, E. (2013). Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. *Veterinary Microbiology*, 166 (3-4), 590-594. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.018.

Mateus, L., & Eilts, B. E. (2010). Cystic Endometrial Hyperplasia and Pyometra. In S. J. Ettinger & E. C. Feldman (Eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult* (7^a ed., vol. 2, pp. 1668-1688). St Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Marques, L. R., Abe, C. M., Griffin, P. M., & Gomes, T. A. (1995). Association between alpha-hemolysin production and HeLa cell-detaching activity in fecal isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (10), 2707-2709.

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews-Immunology*, 1 (2), 135-145.

Miajlovic, H., & Smith, S. G. (2014). Bacterial self-defence: How *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiology Letters*, 354 (1), 1-9, doi: 10.1111/1574-6968.12419.

Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 122 (4), 143-159. doi: 10.1042/CS20110340.

Mills, M., Meysick, K. C., & O'Brien, A. D. (2000). Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infection and Immunity*, 68 (10), 5869-5880.

Mims, C., Nash, A., & Stephen, J. (2001). *Mims' pathogenesis of infectious disease* (5^a ed.). San Diego: Elsevier.

Monroe, K. M., McWhirter, S. M., & Vance, R. E. (2010). Induction of type I interferons by bacteria. *Cellular Microbiology*, 12 (7), 881-890. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01478.x.

Monroe, K. M., McWhirter, S. M., & Vance, R. E. (2009). Identification of host cytosolic sensors and bacterial factors regulating the type I interferon response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathogens*, 5 (11): e1000665. doi:10.1371/journal.ppat.1000665.

Mukaida, N. (2003). Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284 (4), 566-577.

Mulvey, M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 4 (5), 257-271.

Murphy, P. M. (2013). Chemokines and chemokine receptors. In R. R. Rich (Ed.), *Clinical Immunology: Principles and Practice* (4^a ed, pp. 108-135). St Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Niskanen, M., & Thrusfield, M. V. (1998). Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. *The Veterinary Record*, 143 (18), 493-498.

Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., & Hacker, J. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19, 517-521.

O'Neill, L. A., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors – Redefining innate immunity. *Nature Reviews – Immunology*, 13 (6), 453-460. doi: 10.1038/nri3446.

O'Shea, J. J., Gadina, M., & Siegel, R. (2013). Cytokines and cytokine receptors. In R. R. Rich (Ed.), *Clinical Immunology: Principles and Practice* (4th ed, pp. 108-135). St Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Pasare, C., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptors: Linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*, 6 (15), 1382-1387.

Patterson, N. J., & Werling, D. (2013). To con protection: TIR-domain containing proteins (Tcp) and innate immune evasion. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 155 (3), 147-154. doi: 10.1016/j.vetimm.2013.06.017.

Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124 (4), 715-727.

Plumlee, C. R., Lee, C., Beg, A. A., Decker, T., Shuman, H. A., & Schindler, C. (2009). Interferons direct an effective innate response to *Legionella pneumophila* infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (44), 30058-30066. doi:10.1074/jbc.M109.018283.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C., V., Du, X., ...Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiology* (5th ed). New York, NY: The McGraw-Hill companies.

Pretzer, S. D. (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*, 70 (3), 359-363. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.028.

Qian, C., & Cao, X. (2013). Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1283, 67-74. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06786.x.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, Donnelly, W. J., & Leonard, F. C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (1st ed.). Oxford, Malden: Blackwell Publishing.

Raetz, C. R., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635-700.

Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 881-941.

Reimer, T., Brcic, M., Schweizer, M., & Jungi, T. W. (2008). Poly (I:C) and LPS induce distinct IRF3 and NF- κ B signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 83 (5), 1249-1257.

Rincon, M. (2012). Interleukin-6: From an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends in Immunology*, 33 (11), 571-577. doi: 10.1016/j.it.2012.07.003.

Roitt, I. M., & Delves, P. J. (2001). *Roitt's Essential Immunology* (10^a ed). Malden, Massachusetts: Blackwell Science.

Russo, T. A., Davidson, B. A., Genagon, S. A., Warholc, N. M., MacDonald, U., Pawlicki, P. D.,...Knight, P. R. (2005). *E. coli* virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 289 (2), 1207-1216.

Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases*, 181 (5), 1753-1754.

Saldaña, Z., De la Cruz, M. A., Carrillo-Casas, E. M., Durán, L., Zhang, Y., Hernández-Castro, R., ... Girón, J. A. (2014). Production of the *Escherichia coli* common pilus by uropathogenic *E. coli* is associated with adherence to HeLa and HTB-4 cells and invasion of mouse bladder urothelium. *PLoS One*, 9 (7), e101200. doi: 10.1371/journal.pone.0101200.

Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., ... Taniguchi, T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. *Immunity*, 13 (4), 539-548.

Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (1998). Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF7. *Federation of European Biochemical Societies - Letters*, 441 (1), 106-110.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813 (5), 878-888. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

Schlafer, D. H. (2012). Diseases of the canine uterus. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (6), 318-322. doi: 10.1111/rda.12064.

Schlafer, D. H., & Gifford, A. T. (2008). Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. *Theriogenology*, 70 (3), 349-358. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.041.

Schubert, S., Nörenberg, D., Clermont, O., Magistro, G., Wieser, A., Romann, E.,... Denamur, E. (2010). Prevalence and phylogenetic history of the TcpC virulence determinant in *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300 (7), 429-434. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.02.006.

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., & Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (25), 17406-17409.

Sheldon, I. M., Rycroft, A. N., Dogan, B., Craven, M., Bromfield, J. J., Chandler, A., ... Simpson, K. W. (2010). Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One*, 5 (2), e9192. doi:10.1371/journal.pone.0009192.

Sigiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, R.,... Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209 (8), 619-627.

Silva, E., Henriques, S., Brito, S., Ferreira-Dias, G., Lopes-da-Costa, L., & Mateus, L. (2012). Oestrous cycle-related changes in production of Toll-like receptors and prostaglandins in the canine endometrium. *Journal of Reproductive Immunology*, 96 (1-2), 45-57. doi: 10.1016/j.jri.2012.07.003.

Silva, E., Leitão, S., Henriques, S., Kowalewski, M. P., Hoffmann, B., Ferreira-Dias, G.,... Mateus, L. (2010). Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *Journal of Reproductive Immunology*, 84 (1), 66-74. doi: 10.1016/j.jri.2009.10.004.

Siqueira, A. K., Ribeiro, M. G., Leite, D. S., Tiba, M. R., Moura, C., Lopes, M. D.,...Silva, A. V. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86 (2), 206-210. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.07.018.

Skaar, E. P. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathogens*, 6 (8). doi: 10.1371/journal.ppat.1000949.

Smith, F. O. (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, 66 (3), 610-612.

Song, D. H., & Lee, J.-O. (2012). Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunological Reviews*, 250 (1), 216-229. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01167.x.

Sousa, C. P. (2006). The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: A mini review. *Journal of Venomous Tropical Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12 (3), 363-373.

Spurbeck, R. R., & Mobley, H. L. T. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli*. In M. S. Donnenberg (Ed.) *Escherichia coli: Pathotypes and principles of pathogenesis* (2^a ed, pp. 275-304). London, UK: Elsevier.

Stadler, K., Handler, J., Schoenkypl, S., & Walter, I. (2009) A three-dimensional culture model of canine uterine glands. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 45 (1-2), 35-43. doi: 10.1007/s11626-008-9127-8.

Stetson, D. B., & Medzhitov, R. (2006). Type I interferons in host defense. *Immunity*, 25 (3), 373-381.

Sultani, M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., & Gibson, R. J. (2012). Anti-inflammatory cytokines: Important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemotherapy Research and Practice*. doi: 10.1155/2012/490804.

Swangchan-Uthai, T., Lavender, C. R. M., Cheng, Z., Fouladi-Nashta, A. A., & Wathes, D. C. (2012). Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biology of Reproduction*, 87 (6), doi: 10.1095/biolreprod.112.102376.

Takaoka, A., & Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cellular Microbiology*, 8 (6), 907-922.

Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17 (1), 1-14.

Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M., & Klinman, D. M. (2001). Cutting edge: Role of toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *Journal of Immunology*, 167 (7), 3555-3558.

Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual Review of Immunology*, 26, 535-584. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., & Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual Review of Immunology*, 19, 623-655.

Taylor, A. W. (2009). Review of the activation of TGF- β in immunity. *Journal of Leucocyte Biology*, 85 (1), 29-33. doi: 10.1189/jlb.0708415.

Tizard, I. R. (2013). *Veterinary Immunology* (9^a ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

Triantafilou, K., Vakakis, E., Orthopoulos, G., Ahmed, M. A., Schumann, C., Lepper, P. M., & Triantafilou, M. (2005). TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1. *European Journal of Immunology*, 35 (8), 2416-2423.

Trinchieri, G. (2010). Type I interferon: Friend or foe? *The Journal of Experimental Medicine*, 207 (10), 2053-2063. doi: 10.1084/jem.20101664.

Tsumagari, S., Ishinazaka, T., Kamata, H., Ohba, S., Tanaka, S., Ishii, M., & Memon, M. A. (2005). Induction of canine pyometra by inoculation of *Escherichia coli* into the uterus and its relationship to reproductive features. *Animal Reproduction Science*, 87 (3-4), 301-308.

Turner, M. L., Healey, G. D., & Sheldon, I. M. (2012). Immunity and inflammation in the uterus. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 402-409. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02104.x.

Uematsu, S., & Akira, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *Journal of Molecular Medicine*, 84 (9), 712-725.

Verstegen, J., Dhaliwal, G., & Verstegen-Onclin, K. (2008). Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, 70 (3), 364-374. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.036.

Ververidis, H. N., Boscos, C. M., Stefanakis, A., Saratsis, P., Stamou, A. I., & Krambovitis, E. (2004). Serum estradiol 17- β , progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. *Theriogenology*, 62 (3-4), 614-623.

Wadas, B., Kühn, I., Lagerstedt, A. S., & Jonsson, P. (1996). Biochemical phenotypes of *Escherichia coli* in dogs: Comparison of isolates isolated from bitches suffering from pyometra and urinary tract infection with isolates from faeces of healthy dogs. *Veterinary Microbiology*, 52 (3-4), 293-300.

Wagner, H. (2002). Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Microbiology*, 5 (1), 62-69.

Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58, 611-647.

Watts, J. R., Wright, P. J., & Whithear, K. C. (1996). Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *The Journal of Small Animal Practice*, 37 (2), 54-60.

Werling, D., & Jungi, T. W. (2003). Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91 (1), 1-12.

Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85 (1), 11-19. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.03.007.

Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Capsule and lipopolysaccharide. In M. S. Donnenberg (Ed.) *Escherichia coli: Pathotypes and principles of pathogenesis* (2^a ed, pp. 533-556). London, UK: Elsevier

Yadav, M., Zhang, J., Fischer, H., Huang, W., Lutay, N., Cirl, C.,...Svanborg, C. (2010). Inhibition of TIR domain signaling by TcpC: MyD88-dependent and independent effects on *Escherichia coli* virulence. *PLoS Pathogens*, 6 (9): e1001120. doi:10.1371/journal.ppat.1001120.

Yasunaga, Y., Takeuchi, T., Shimokawa, T., Asano, A., Nabeta, M., & Ohta, Y. (2013). Sugar expression in the mucosae of the canine uterus and vagina during the oestrous cycle and with pyometra. *The Veterinary Journal*, 196 (1), 116-118. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.08.008.

Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., & Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: Activation of a transcription

factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *The EMBO Journal*, 17 (4), 1087-1095. doi: 10.1093/emboj/17.4.1087.

Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H., & Alexander, C. (2008). TLR2 – promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*, 213, 205-224. doi: 10.1016/j.imbio.2008.02.005.